

TESIS DOCTORAL

Estudio *in vitro* de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes

Memoria presentada por **Ana Peropadre López**
para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid
en el Programa de Doctorado de Genética y Biología Celular

2014

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido llevado a cabo en la Unidad de Biología Celular del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección de la **Dra. M^a José Hazen de San Juan**, con financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación (CTM2008-00311) y del Ministerio de Economía y Competitividad (CTM2012-31344).

*«Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran
belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico:
es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le
impresionan como un cuento de hadas»*

M. Curie

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
1. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS	9
1.1. MÉTODOS ALTERNATIVOS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	12
1.2. LÍNEAS CELULARES COMO MODELO EN TOXICOLOGÍA	14
1.3. CRITERIOS GENERALES SOBRE EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN TOXICOLOGÍA	18
2. CONTAMINANTES EMERGENTES	22
2.1. PLASTIFICANTES. EL DI (2-ETILHEXIL) FTALATO	24
2.2. FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL. EL TRICLOSÁN	25
2.3. TENSIOACTIVOS PERFLUORADOS. EL ÁCIDO PERFLUOROOCTANOICO	28
OBJETIVOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	35
1. COMPUESTOS QUÍMICOS	37
2. CULTIVOS CELULARES	38
2.1. LÍNEAS CELULARES	38
2.2. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS	42
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	43
3.1. TOXICIDAD AGUDA	43
3.2. TOXICIDAD POR EXPOSICIÓN PROLONGADA	44
3.3. TOXICIDAD RETARDADA	45
4. METODOLOGÍA	47
4.1. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR	47
4.1.1. Reducción del MTT	47
4.1.2. Captura de rojo neutro	48

ÍNDICE

4.2. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN	49
4.2.1. Ensayo de Bradford	49
4.2.2. Recuento de índice mitótico	50
4.2.3. Recuento del número de células	51
4.2.4. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	52
4.3. MORFOLOGÍA CELULAR	52
4.3.1. Análisis morfológico <i>in vivo</i>	53
- Microscopía óptica de contraste de fase	53
- Marcaje supravital con naranja de acridina	54
- Marcaje supravital con rodamina 123	54
4.3.2. Detecciones fluorescentes específicas	55
- Inmunodetecciones: α -tubulina, caspasa 3 activa y anexina A1	55
- Detección de actina	56
4.3.3. Pruebas específicas	57
- Lípidos	57
- Glucógeno	58
- Bromuro de etidio / Naranja de acridina	58
- β -Galactosidasa asociada a senescencia	59
4.3.4. Análisis de ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión	60
4.4. ANÁLISIS DE DAÑO AL ADN	61
4.4.1. Inmunodetección de 8-OHdG	61
4.4.2. Inmunodetección de γ -H2AX	63
4.5. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	64
4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAY DE ADN	67
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	71

RESULTADOS	73
1. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD AGUDA. EL DI (2-ETILHEXIL) FTALATO	75
1.1. EFECTOS DEL DEHP SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA VIABILIDAD CELULAR	75
1.2. ALTERACIONES SUBCELULARES ASOCIADAS CON LA EXPOSICIÓN A DEHP	79
1.3. ANÁLISIS DE MARCADORES DE ESTRÉS DE RETÍCULO TRAS LA EXPOSICIÓN A DEHP	81
1.4. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL DEHP	82
2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD POR EXPOSICIÓN PROLONGADA. EL TRICLOSÁN	83
2.1. EFECTOS DEL TCS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	84
2.2. ANÁLISIS ESPECÍFICOS DE DAÑO AL ADN TRAS LA EXPOSICIÓN A TCS	89
2.3. APROXIMACIÓN GENÓMICA PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TCS	92
2.4. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL TCS	94
3. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD RETARDADA. EL ÁCIDO PERFLUOROOCETANOICO	95
3.1. VALORACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL PFOA	95
3.2. EFECTOS DEL PFOA SOBRE LA TASA DE DIVISIÓN CELULAR	101
3.3. ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS CELULARES ASOCIADAS A LA RETIRADA DEL PFOA	104
3.4. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL PFOA	107
DISCUSIÓN	109
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXOS	167
ANEXO I. Resumen de los genes alterados después de 120h de exposición a TCS 0.5/1 µM	167
ANEXO II. Publicaciones científicas	171
- Cytotoxic effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on cultured mammalian cells	175
- Di (2-ethylhexyl) phthalate induces endoplasmic reticulum stress in renal and epithelial cultured cells	183

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Principales características físico-químicas de los compuestos objeto de estudio	37
TABLA 2. Solventes, soluciones iniciales y rango de concentraciones evaluado de los tres compuestos analizados en este trabajo	38
TABLA 3. Características principales de la línea celular establecida HaCaT	39
TABLA 4. Características principales de la línea celular establecida HeLa	39
TABLA 5. Características principales de la línea celular establecida MCF7	40
TABLA 6. Características principales de la línea celular establecida MDA-MB-231	41
TABLA 7. Características principales de la línea celular establecida Vero	41
TABLA 8. Número de células por mililitro sembradas según el tipo celular y el tiempo de exposición al compuesto	43
TABLA 9. Anticuerpos empleados en la inmunodetección fluorescente de proteínas	56
TABLA 10. Composición del tapón de lisis empleado en la técnica de western blot	65
TABLA 11. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas por western blot	65
TABLA 12. Análisis de correlación de los ensayos de viabilidad con respecto al contenido de proteína celular total en las líneas celulares estudiadas	65
TABLA 13. Número de genes por línea celular cuya expresión se vio alterada significativamente después de 120 horas de exposición a TCS 0.5/1 μ M	92
TABLA 14. Análisis de correlación entre las distintas condiciones de exposición a PFOA (24h, 24+48h y 72h) para cada ensayo de citotoxicidad basal llevado a cabo en las líneas celulares HeLa y HaCaT	97
TABLA 15. Resumen de los genes alterados después de 120h de exposición a TCS 0.5/1 μ M	169

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribución de los animales de laboratorio utilizados en Europa en el año 2011 en función de los trabajos para los que fueron destinados (izquierda) y, de aquellos dirigidos a evaluaciones toxicológicas y otras evaluaciones de seguridad, porcentaje de animales empleados en base a distintos objetivos experimentales (derecha)	10
FIGURA 2. Componentes principales de los estudios toxicológicos: caracterización química de sustancias, estudio de las vías de toxicidad, aplicación de modelos dosis-respuesta y de extrapolación, y valoración de los datos procedentes de estudios epidemiológicos	11
FIGURA 3. Etapas en la respuesta celular a estrés y a los estímulos nocivos	17
FIGURA 4. Curva dosis-respuesta estándar. Se representan parámetros de relevancia toxicológica, como el nivel sin efecto observado (NOEL, <i>No Observed Effect Level</i>), el menor nivel con efecto observable (LOEL, <i>Least Observable Effect Level</i>) y la concentración efectiva que causa el 50% del efecto máximo (EC50, <i>Effective Concentration 50</i>)	18
FIGURA 5. Principales dianas celulares en la evaluación <i>in vitro</i> de la citotoxicidad de productos químicos	21
FIGURA 6. Ejemplos de materiales plásticos que incorporan DEHP en su composición. De izquierda a derecha, bolsas para la transfusión de sangre, botellas y cables eléctricos	24
FIGURA 7. Ejemplos de productos de uso cotidiano que contienen triclosán. De izquierda a derecha, pasta dentífrica, juguetes infantiles y jabón de manos	27
FIGURA 8. Ejemplos de materiales para cuya fabricación se emplea PFOA. De izquierda a derecha, menaje antiadherente de cocina, prendas impermeables y revestimientos plásticos de equipos informáticos	29
FIGURA 9. Diseño experimental de los estudios de toxicidad aguda. En esta aproximación metodológica, las células permanecieron expuestas al compuesto de estudio durante 24h. Transcurrido este tiempo, las células se procesaron de acuerdo con los distintos procedimientos experimentales	44
FIGURA 10. Diseño experimental de los estudios de toxicidad por exposición prolongada. En esta aproximación metodológica, las células permanecieron expuestas al compuesto de estudio durante 120h, reponiendo la droga tras las primeras 72h. Finalizado el tratamiento, las células se procesaron de acuerdo con los distintos procedimientos experimentales	45
FIGURA 11. Diseño experimental de los estudios de toxicidad retardada. Tras 24h de exposición al compuesto, las células permanecieron 48h / 8 días en medio de cultivo libre de droga. Transcurrido este tiempo, las células se procesaron de acuerdo con los distintos procedimientos experimentales	46

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 12. Citotoxicidad basal del DEHP en células Vero (A) y HaCaT (B) expuestas durante 24h a concentraciones crecientes del compuesto. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos en los diferentes ensayos: contenido de proteína celular total (CPT), reducción de la sal de tetrazolio MTT e incorporación de rojo neutro (RN)	75
FIGURA 13. Estudio morfológico <i>in vivo</i> de células Vero (A) y HaCaT (B) expuestas 24h a DEHP 10 y 100 μM . Se muestran imágenes representativas de la morfología celular general en contraste de fase (CF), así como de la integridad del compartimento endosomal y el retículo mitocondrial mediante marcaje supravital con naranja de acridina (NA) y rodamina 123 (Ro123), respectivamente. Los tratamientos dieron lugar a la aparición de vesículas refringentes en el citoplasma (cabezas de flecha), la alcalinización del compartimento endosomal y una leve fragmentación del retículo mitocondrial	76
FIGURA 14. Efecto del DEHP sobre la progresión del ciclo celular de células Vero (A) y HaCaT (B) tras exposiciones de 24h a una concentración del compuesto de 100 μM . Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos	79
FIGURA 15. Alteraciones subcelulares de células Vero y HaCaT expuestas 24h a DEHP 100 μM . (A) Detección de gotas lipídicas mediante tinción con Rojo Nilo. (B) Marcaje de acumulaciones de glucógeno mediante la reacción del PAS. (C) Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión. Las cabezas de flecha indican los depósitos de glucógeno intracelular (partículas α) en células Vero y los asteriscos muestran dilatación del RE en células HaCaT	80
FIGURA 16. Análisis por <i>Western blot</i> de marcadores de estrés de RE en células Vero (A) y HaCaT (B) tratadas con DEHP 100 μM durante 4h y 24h. Se indican los valores de inducción relativa, que expresan la cantidad de proteína presente en las muestras tratadas con respecto a las muestras no tratadas, tras la normalización de la carga con respecto a la proteína γ -tubulina. Las imágenes son representativas de un mínimo de tres experimentos independientes	82
FIGURA 17. Citotoxicidad basal del TCS en células HaCaT (A), MDA (B) y MCF7 (C) expuestas durante 24h a concentraciones crecientes del compuesto. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos en los diferentes ensayos: contenido de proteína celular total (CPT), reducción de la sal de tetrazolio MTT e incorporación de rojo neutro (RN). Se incluyen los valores de EC50 ($M \pm SD$) para cada uno de los ensayos (D)	83
FIGURA 18. Efecto del TCS sobre el contenido de proteína celular total de células HaCaT, MDA y MCF7 expuestas al compuesto durante 120h. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos	85

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 19. Efecto del TCS sobre la progresión del ciclo celular de células humanas en cultivo. (A) Células HaCaT tratadas 24h con TCS 0.5 y 10 μ M. (B) Células HaCaT tratadas 120h con TCS 0.5 y 2 μ M. (C) Células MDA tratadas 24h con TCS 1 y 10 μ M. (D) Células MDA tratadas 120h con TCS 1 y 2 μ M. (E) Células MCF7 tratadas 24h con TCS 1 y 10 μ M. (F) Células MCF7 tratadas 120h con TCS 1 y 2 μ M. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos	86
FIGURA 20. Efecto del TCS sobre la tasa de división celular. Se representan los valores de índice mitótico ($M \pm SD$) de células HaCaT, MDA y MCF7 expuestas a distintas concentraciones de TCS durante 24h (A) y 120h (B). Incrementos (\blacktriangle) y descensos (\blacktriangledown) significativos con respecto al control ($p \leq 0.05$). (C) Imágenes representativas de células HaCaT control, en interfase y en división, marcadas con anti- α -tubulina (α -Tub) y Hoechst 33258 (Ho)	87
FIGURA 21. Medida de la proliferación de células HaCaT (A), MDA (B) y MCF7 (C) mediante recuento directo de células viables ($M \pm SD$). Para cada línea celular, se representa la evolución del cultivo control en comparación con el tratado con TCS 0.5 (HaCaT) o 1 μ M (MDA, MCF7) durante 72h y 120h	89
FIGURA 22. Detección del daño oxidativo al ADN mediante el marcaje inmunocitoquímico de 8-OHdG. Se representa el porcentaje con respecto al control ($M \pm SD$) del índice de 8-OHdG en células HaCaT, MDA y MCF7 expuestas a TCS durante 24h (A) 120h (B). Incrementos (\blacktriangle) y descensos (\blacktriangledown) significativos con respecto al control ($p \leq 0.05$). (C) Imágenes representativas de células HaCaT control y tratadas	90
FIGURA 23. Detección específica de roturas de doble cadena de ADN mediante marcaje inmunofluorescente contra γ -H2AX y contratinción de núcleos con Hoechst 33258 (Ho). Se representan los porcentajes ($M \pm SD$) de células HaCaT, MDA y MCF7 marcadas positivamente tras la exposición a TCS durante 24h (A) 120h (B). Incrementos (\blacktriangle) y descensos (\blacktriangledown) significativos con respecto al control ($p \leq 0.05$). (C) Imágenes representativas de células HaCaT control y tratadas	91
FIGURA 24. Análisis de la expresión génica de células tratadas durante 120h con TCS 0.5 μ M (HaCaT) o 1 μ M (MDA y MCF7), mediante el empleo de Cholestchip TM . (A) Análisis jerárquico del microarray completo. (B) Análisis jerárquico de los genes expresados diferencialmente en al menos una de las líneas celulares. (C) Análisis de conjuntos o <i>cluster</i> por distancias euclídeas	93
FIGURA 25. Citotoxicidad basal del PFOA en células HeLa (A, C y E) y HaCaT (B, D y F) expuestas a concentraciones crecientes del compuesto durante 24h, 24+48h y 72h. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos en los diferentes ensayos: contenido de proteína celular total (CPT), reducción de la sal de tetrazolio MTT e incorporación de rojo neutro (RN)	96

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 26. Morfología celular general de células HeLa y HaCaT expuestas a PFOA durante 24h, 24+48h y 72h. Se muestran, a modo de ejemplo, imágenes representativas de los tratamientos con PFOA 50 μ M. En células HeLa destacan los fenómenos de retracción celular y la presencia de alteraciones en la membrana en forma de <i>blebs</i> . En células HaCaT se observa la aparición de pequeñas vacuolas citoplasmáticas y una leve tumefacción turbia en los tratamientos más prolongados	98
FIGURA 27. Estudio mediante microscopía óptica de epifluorescencia de los procesos celulares asociados a la aparición de <i>blebs</i> en células HeLa tratadas con PFOA. Se valoró la integridad de la membrana plasmática mediante marcaje <i>in vivo</i> con bromuro de etidio y naranja de acridina (BE/NA), la posible aparición de procesos apoptóticos mediante inmunodetección contra caspasa 3 activa, el estado del citoesqueleto de actina mediante detección específica de esta proteína con faloidina conjugada con TRITC y la aparición de procesos de reparación de la membrana plasmática mediante inmunodetección contra anexina A1	100
FIGURA 28. Recuentos de IM en células HeLa (A, C y E) y HaCaT (B, D, y F) expuestas a concentraciones crecientes de PFOA durante 24h, 24+48h y 72h. Se representa la tasa de división como porcentaje respecto al control ($M \pm SD$), así como el porcentaje relativo de células en cada una de las fases de la mitosis	102
FIGURA 29. Análisis morfológico del patrón de microtúbulos de células HeLa expuestas a PFOA, mediante inmunodetección específica de α -tubulina (α -Tub) y contratinción de núcleos con Hoechst 33258 (Ho). Se muestran, a modo de ejemplo, imágenes representativas de los tratamientos de 24+48h, en las que se observa un incremento en el número de células en mitosis, así como la presencia de cromosomas no congregados (imágenes de mayor aumento)	103
FIGURA 30. Análisis del ciclo celular de células HeLa (A) y HaCaT (B) tratadas con PFOA durante 24h y crecidas los 8 días posteriores en medio de cultivo libre del compuesto. Se representan las frecuencias relativas ($M \pm SD$) de células en cada fase del ciclo, obtenidas mediante citometría de flujo	104
FIGURA 31. Valoración de la inducción de procesos senescentes en células HeLa y HaCaT tratadas con PFOA 50 μ M durante 24h y crecidas los 8 días posteriores en medio de cultivo libre del compuesto. Se representa como porcentaje respecto al control ($M \pm SD$) el número de células positivas a la actividad de la enzima β -galactosidasa (A). Imágenes representativas de células HaCaT control y tratadas (B)	105
FIGURA 32. Detección del daño oxidativo al ADN mediante el marcaje inmunocitoquímico de 8-OHdG en células HeLa y HaCaT tratadas con PFOA 50 μ M. Se representa el porcentaje con respecto al control ($M \pm SD$) del índice de 8-OHdG después de tratamientos de 24h (A) y 24h más 8 días en medio de cultivo libre del compuesto (B)	106

ABREVIATURAS

8-OHdG. 8-hidroxi-2'-deoxuguanosina	DEHP. Di (2-etilhexil) ftalato
ACS. <i>American Chemical Society</i>	DMEM. Medio de Eagle modificado por Dulbecco
ADN. Ácido desoxirribonucleico	DMSO. Dimetilsulfóxido
ADNc. ADN complementario	DS. Desviación estándar
ANOVA. Análisis de la varianza	DSBs. Roturas de doble cadena
ARN. Ácido ribonucleico	EC50. Concentración que produce el 50% del efecto observado
ARNm. ARN mensajero	ECHA. <i>European Chemical Agency</i>
ATCC. <i>American Type Culture Collection</i>	EDTA. Ácido etilendiaminetetraacético
ATF6. <i>Activating transcription factor 6</i>	EE.UU. Estados Unidos
ATM. <i>DNA damage inducible kinase</i>	elf2α. <i>Eukaryotic translation initiation factor 2α</i>
ATSDR. <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>	EPA. <i>Environmental Protection Agency</i>
Bcl2. <i>B-cell lymphoma 2</i>	ERAD. Degradación asociada al RE
BE. Bromuro de etidio	FDA. <i>Food and Drug Administration</i>
BSA. Albúmina de suero bovino	GRP78/BiP. <i>Glucose-regulated protein of 78 kda/immunoglobulin heavy chain-binding protein</i>
CAS. <i>Chemical Abstracts Service</i>	IARC. <i>International Agency for Research on Cancer</i>
CCD. Dispositivo de carga acoplada	IF. Índice de fases
CDK. Quinasa dependiente de ciclina	IM. Índice mitótico
CHOP/GADD153. <i>C/EBP-homologous protein/growth arrest and DNA damage 153</i>	IRE1. <i>Inositol requiring protein-1</i>
CLD. Acúmulos de lípidos citoplasmáticos	LD50. Dosis letal media
CPT. Contenido de proteína total	M. Media
DAB. Diaminobencidina	MET. Microscopía electrónica de transmisión
DDT. Dicloro-difenil-tricloroetano	MTT. Bromuro de tetrazolio

ABREVIATURAS

NA. Naranja de acridina

NOEC. Concentración sin efecto observado

NRs. Receptores nucleares activados por ligando

OCDE. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

OMS. Organización Mundial de la Salud

PBS. Tampón fosfato salino

PERK. *Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*

PFOA. Ácido perfluorooctanoico

PFOS. Perfluorooctano

PPARs. *Peroxisome proliferator-activated receptors*

PPCPs. Fármacos y productos de cuidado personal

PVC. Cloruro de polivinilo

QSAR. Relación cuantitativa estructura-actividad

RE. Retículo endoplásmico

REACH. Registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y los preparados químicos

RN. Rojo neutro

Ro123. Rodamina 123

TA. Temperatura ambiente

TCS. Triclosán

TEMED. Tetrametiletilendiamina

TRITC. Tetrametilrodamina

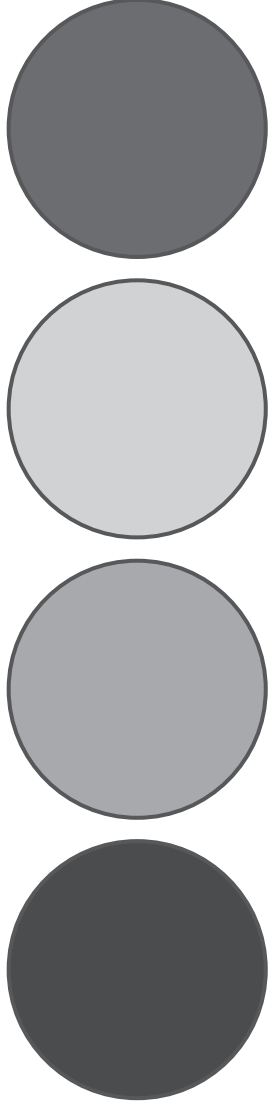
UNESCO. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura

UPR. Respuesta a proteínas mal plegadas

XBP1. *X-box binding protein 1*

γ -H2AX. Variante de la histona H2A fosforilada en el residuo Ser139

RESUMEN



En una sociedad industrializada como la actual, los procesos de fabricación de productos de consumo, así como las actividades comerciales y de la vida diaria, suponen la emisión constante al medio ambiente de una gran variedad de productos químicos. A pesar de que muchos de ellos se han venido utilizando durante décadas, apenas tenemos información de sus efectos para nuestra salud y la de nuestro entorno. Entre los xenobióticos que demandan una atención más urgente se encuentran los denominados “contaminantes emergentes”, un grupo de sustancias químicas entre las que se incluyen, entre otros, plastificantes, fármacos y productos de cuidado personal y compuestos perfluorados.

El empleo de animales de experimentación en Toxicología ha conllevado en las últimas décadas un creciente número de conflictos científicos, éticos, legislativos y económicos. En paralelo a la mayor demanda de información sobre los efectos para la salud de las sustancias químicas, se viene produciendo una mayor presión para disminuir el número de experimentos con animales. Las estrategias de evaluación *in vitro* representan una aplicación manifiesta del principio de las 3Rs, que ofrece soluciones a los problemas causados por la actual dependencia de los modelos de experimentación animal. Concretamente, los modelos celulares *in vitro* empiezan a ser considerados una herramienta muy conveniente en los procesos de valoración toxicológica, capaces de proporcionar un conocimiento más exhaustivo de las bases mecanicistas de los efectos tóxicos de los xenobióticos a nivel sistémico, celular y molecular. En este sentido, el estudio de las alteraciones de procesos celulares básicos y la determinación de las dosis y los tiempos de exposición que ocasionan efectos adversos resultan una pieza fundamental para la evaluación del riesgo toxicológico.

En el presente estudio se ha planteado una estrategia integrada en la se han combinado distintas aproximaciones experimentales con un análisis multiparamétrico, empleando líneas celulares en cultivo, en su mayoría humanas, para evaluar las respuestas celulares resultantes de la exposición a tres contaminantes emergentes de interés.

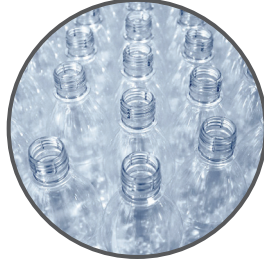
El di (2-etilhexil) ftalato es una sustancia química de alta producción ampliamente utilizada como un plastificante en los productos de PVC. Debido a su presencia ubicua y la exposición constante de la población general, este compuesto ha sido objeto de extensos estudios toxicológicos. A pesar de la información disponible, los datos sobre la citotoxicidad del DEHP en células de mamífero son relativamente limitados. Los resultados de nuestro estudio revelan que 24 horas de exposición a DEHP induce en las células Vero y HaCaT una reducción de la viabilidad celular dependiente de dosis, así como una inhibición de la proliferación celular vinculada a un retraso del ciclo celular en la fase G1. Además, nos proporcionan la prueba sin precedentes de que, a dosis de relevancia clínica, el compuesto desencadena en las células de mamífero una respuesta de estrés de retículo endoplásmico, un mecanismo emergente en la patogénesis y progresión de enfermedades metabólicas y otras enfermedades humanas.

El triclosán es un agente antimicrobiano de amplio espectro que se ha venido utilizando como conservante de forma habitual durante los últimos 40 años, lo que ha provocado que en la actualidad constituya uno de los compuestos químicos más detectados en el medio ambiente. Aunque existen numerosos estudios que asocian la exposición a este compuesto con diversos efectos adversos para la salud humana y ambiental, resulta especialmente preocupante el desconocimiento que existe hasta la fecha sobre los mecanismos subyacentes a sus efectos nocivos. En el presente estudio hemos demostrado que exposiciones de 120 horas a bajas concentraciones del compuesto (0.5/1 μM) ejercen un claro efecto mitogénico e incrementos de ploidía en las líneas celulares HaCaT, MDA y MCF7. Nuestro estudio también revela que los tratamientos de 24 horas ejercen un efecto antiproliferativo concomitante con la inducción de daño oxidativo al ADN.

El ácido perfluorooctanoico pertenece al grupo de los tensioactivos perfluoralquilados, compuestos orgánicos altamente estables empleados masivamente desde hace más de 50 años en la fabricación de revestimientos plásticos, detergentes, teflón y Gore-Tex®. Debido a su presencia ubicua y su elevado tiempo de retención en los tejidos, diversos estudios toxicológicos se han centrado en analizar los posibles efectos adversos del compuesto, sin que su mecanismo de acción no esté completamente caracterizado hasta la fecha. Nuestros resultados demuestran que los efectos producidos por el PFOA en las células HeLa y HaCaT a las 24 horas no revierten con la retirada del compuesto durante 48 horas. Estos efectos, relacionados con el daño de la membrana plasmática y la inducción de estrés oxidativo, dieron lugar en las células HeLa a una respuesta adaptativa. Por su parte, las células HaCaT presentaron un fenotipo compatible con procesos de senescencia celular después de permanecer 8 días en cultivo en medio libre de droga.

Aunque aún falta mucha investigación por hacer, los nuevos datos mecanicistas aportados en este estudio pueden contribuir sustancialmente a la información sobre los efectos tóxicos de estos contaminantes emergentes en células de mamífero. Nuestros resultados también ponen de relieve la importancia de establecer con mayor precisión las relaciones de causalidad entre productos químicos industriales ampliamente utilizados y enfermedades humanas.

INTRODUCCIÓN



La contaminación del medio ambiente por materias residuales procedentes de las actividades humanas es, sin lugar a dudas, uno de los principales problemas con los que se enfrenta la sociedad actual. El auge de la industria química durante el siglo XX y comienzos del XXI ha provocado que actualmente existan más de 80 millones de sustancias químicas comercialmente disponibles, indexadas en la sección del *Chemical Abstracts Service* (CAS®) de la Sociedad Americana de Química (ACS, *American Chemical Society*). A pesar de que las políticas medioambientales se han encaminado en los últimos años a ejercer un mayor control sobre esa enorme cantidad de sustancias, lo cierto es que poco más de 300 000 aparecen recogidas en el listado de sustancias químicas reguladas (CHEMLIST®, *Regulated Chemicals Listing*), una base de datos electrónica donde se encuentran recogidas aquellas sustancias sujetas a algún tipo de regulación en los principales mercados del mundo, contando entre ellas con productos químicos de alta producción (HPV, *High Production Volume*), sustancias prioritarias, productos peligrosos con restricciones en su transporte, así como inventarios de vertidos contaminantes (CAS, 2013).

Dentro del amplio espectro de compuestos químicos disponibles en el mercado encontramos plaguicidas, detergentes, productos industriales, aditivos alimentarios, cosméticos, compuestos farmacéuticos, etc. Su empleo generalizado hace que, bien durante su fabricación, procesado y distribución, o bien debido a su uso y posterior eliminación, estos productos acaben siendo liberados al medio natural. Por ejemplo, en Norteamérica se vertieron al medio ambiente 5.7 millones de toneladas de contaminantes en el año 2006, de las que 1.8 millones se correspondieron con sustancias consideradas persistentes, bioacumulables o tóxicas, 970 000 con sustancias carcinógenas o que se sospechaba que podían serlo y 857 000 con sustancias que estaban consideradas como tóxicas para la reproducción o el desarrollo (UNEP, 2012).

Uno de los primeros casos documentados acerca del impacto de la contaminación ambiental sobre la salud humana tuvo lugar en los años 50, cuando comenzaron a aparecer afectados por la enfermedad de Minamata. Los vertidos industriales de mercurio en los ríos japoneses fueron transformados por la actividad microbiana en metilmercurio, que se incorporó a humanos desde el pescado a través de la cadena alimentaria, causando un síndrome neurológico caracterizado por convulsiones, inconsciencia, alteraciones mentales y coma (Repetto *et al.*, 2008a). Sin embargo, no fue hasta la década siguiente cuando tuvieron lugar las primeras llamadas de atención sobre el alcance global del deterioro ambiental y su impacto para la salud humana. En 1962 Rachel Carson publica "*Primavera Silenciosa*", libro de gran impacto internacional que advierte de los riesgos derivados del uso abusivo de fertilizantes y pesticidas. Las evidencias expuestas por Carson a partir de sus investigaciones científicas fueron demoledoras. «Nosotros nos sentimos adecuadamente impresionados por los efectos genéticos de la radiación; ¿por qué, entonces, podemos quedarnos indiferentes al mismo efecto causado por

los productos químicos que diseminamos ampliamente a nuestro alrededor?», se preguntaba en esta obra. La importante polémica generada por el *best seller* culminó con la prohibición en 1972 del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), por considerarlo un potencial cancerígeno para el hombre (ATSDR, 2002a).

Desde entonces, los estudios epidemiológicos no han hecho sino reforzar la idea de que la presencia ubicua de agentes químicos tiene graves repercusiones sobre nuestra salud y la de nuestro entorno. Son cada vez más los resultados que indican una posible correlación entre la contaminación ambiental y determinadas patologías humanas, entre las que destacan dolencias de tipo respiratorio (Sunyer *et al.*, 2006), inmunodepresión severa y alergias (Jalava *et al.*, 2007; Edwards y Myers, 2007), así como ciertas patologías neurodegenerativas. Tal es el caso de las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, que han sido relacionadas con la exposición a pesticidas (Brown *et al.*, 2006; Ascherio *et al.*, 2006) y metales, respectivamente (Wu *et al.*, 2008; Rodella *et al.*, 2008). Asimismo, existen datos tanto experimentales como epidemiológicos que asocian la exposición continua a sustancias químicas de uso cotidiano (plastificantes, pesticidas, pirorretardantes, etc.) con alteraciones del sistema endocrino y del aparato reproductor de diferentes grupos taxonómicos, incluyendo humanos (Colborn *et al.*, 1993; Tyler *et al.*, 1998; Oetken *et al.*, 2004; Porte *et al.*, 2006), así como con la inducción de algunos tipos de cáncer (Kortenkamp, 2006; Irigaray *et al.*, 2007; Pogribny y Rusyn, 2012).

Ya en 2004 numerosos científicos e intelectuales, entre los que se encontraban varios premios Nobel, firmaron el conocido como “Llamamiento de París” en la conferencia internacional de la UNESCO “Cáncer, medio ambiente y sociedad”. Este documento advierte del impacto que tiene la contaminación química ambiental sobre la salud humana y declara lo siguiente (ARTAC, 2004):

- Artículo 1. El desarrollo de numerosas enfermedades actuales es consecuencia del deterioro del medio ambiente.
- Artículo 2. La contaminación química constituye una amenaza grave para la infancia y para la supervivencia del ser humano.
- Artículo 3. Estando en peligro nuestra salud, la de nuestros hijos y la de las generaciones futuras, es la misma especie la que está amenazada.

Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó en 2011 de que en el mundo 4.9 millones de muertes (8.3% del total) y 86 millones de años de vida perdidos (DALYs, *Disability-Adjusted Life Years*) (5.7% del total) eran atribuibles a la exposición medioambiental y la gestión de sustancias químicas (UNEP, 2012).

1. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

El uso generalizado de compuestos sintéticos y la continua liberación de los mismos al medio ambiente hace que las vías de exposición a productos potencialmente nocivos sean de lo más variado. Resulta considerablemente difícil predecir el impacto biológico real de la exposición a xenobióticos, ya que en la mayoría de las ocasiones las evaluaciones rutinarias previas a la comercialización de sustancias químicas no incluyen estudios toxicológicos exhaustivos (Bus y Becker, 2009), desconociéndose de este modo los mecanismos de acción tóxica concretos o los problemas derivados de su presencia constante y persistente en el medio ambiente. En este contexto, es de vital importancia encaminar nuestros esfuerzos hacia el estudio de los posibles efectos adversos de estas sustancias y profundizar en el conocimiento de los riesgos derivados de la exposición a las mismas. El abordaje científico de este grave problema debe combinar el empleo de análisis químicos sensibles que garanticen la detección rápida de sustancias tóxicas, tanto en muestras biológicas como en matrices ambientales, con el desarrollo de aproximaciones metodológicas eficaces para el estudio de sus posibles efectos nocivos (Hartung, 2009; Walker *et al.*, 2012).

La evaluación toxicológica de compuestos químicos se ha basado históricamente en el empleo de ensayos *in vivo*, expresando la toxicidad en función de los efectos agudos provocados por la acción de una única administración de la sustancia objeto de estudio (Andersen y Krewski, 2009; Krewski *et al.*, 2010). Concretamente, la dosis letal media (LD50, *Lethal Dose 50*), equivalente a la cantidad de sustancia necesaria para producir la muerte del 50% de la población de animales de un ensayo, ha sido empleada tradicionalmente como valor de referencia para indicar la potencia de cualquier tipo de tóxico. Aunque en la actualidad diversos países han adoptado medidas para la prohibición de este método de ensayo y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, *Organisation for Economic Co-operation and Development*) abolió el requisito de la prueba en 2002, promulgando directivas que reducen significativamente el número de animales empleados (OECD, 2001a,b, 2008), lo cierto es que el uso de vertebrados sigue formando parte habitual de la experimentación en Toxicología. Sólo en Europa, cerca del 10% de los 11.5 millones de animales de experimentación utilizados en 2011 fueron empleados en estudios toxicológicos (Fig. 1) (EU, 2013).

Es evidente que la Toxicología no ha quedado al margen de los progresos científico-técnicos que han tenido lugar durante las últimas décadas. Así, esta ciencia se ha visto favorecida de forma muy notable con el desarrollo de disciplinas como la Biología celular y molecular, habiéndose incorporado nuevas técnicas que van desde el empleo del microscopio electrónico hasta la manipulación genética de los animales de experimentación, lo que ha tenido una importante repercusión en lo que al estudio de los mecanismos de acción tóxica y la identifi-

cación de dianas se refiere. Sin embargo, el paradigma central de las pruebas de evaluación toxicológica se ha mantenido prácticamente sin cambios durante las últimas cinco décadas: la toxicidad de una sustancia química se determina en base a la medida de las respuestas adversas observadas en estudios de dosis altas con grupos homogéneos de animales de laboratorio (NRC, 2007).

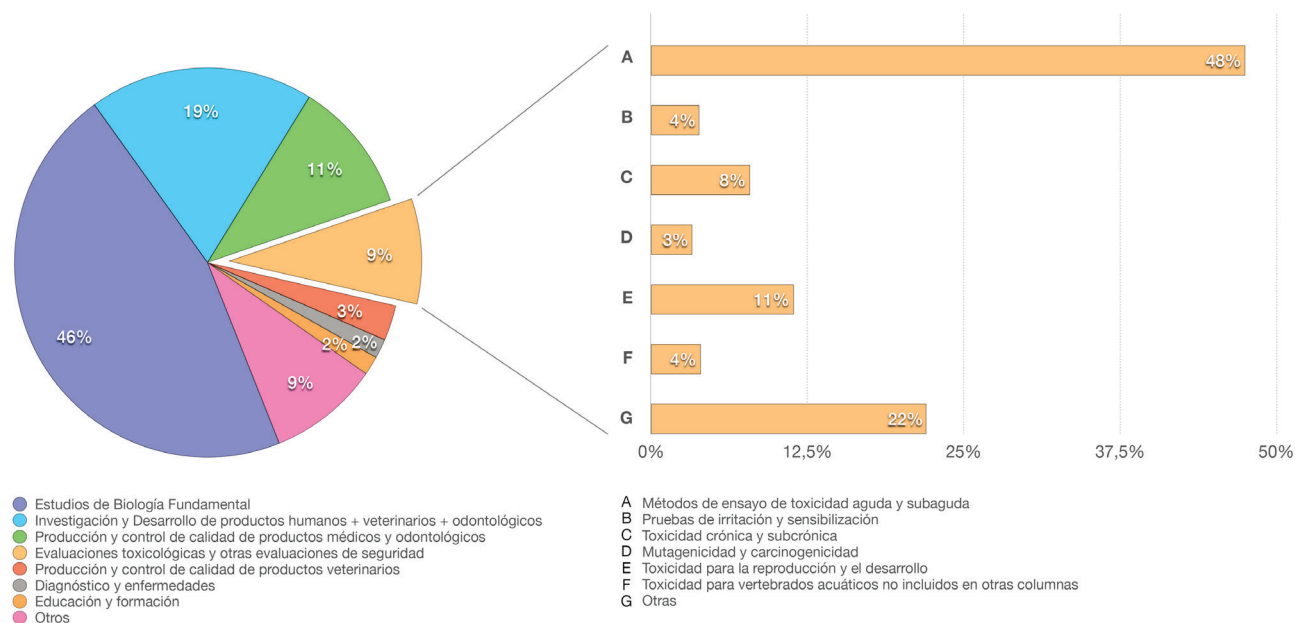


FIGURA 1. Distribución de los animales de laboratorio utilizados en Europa en el año 2011 en función de los trabajos para los que fueron destinados (izquierda) y, de aquellos dirigidos a evaluaciones toxicológicas y otras evaluaciones de seguridad, porcentaje de animales empleados en base a distintos objetivos experimentales (derecha). Modificado de EU, 2013.

El hecho de que la determinación de los riesgos asociados a la exposición química ambiental se base en la caracterización de los estados patológicos de animales de experimentación expuestos a dosis muy superiores a las reales presenta ciertos inconvenientes, como el elevado coste y la larga duración de los experimentos, el sufrimiento infligido a los animales, el factor de incertidumbre asociado a la extrapolación de los datos o la imposibilidad de disponer del número suficiente de animales para testar todos los compuestos que aparecen cada año (Krewski *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2010). En respuesta a estas cuestiones, en 2004 la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA, *Environmental Protection Agency*) encargó a un comité de la Academia Nacional de Ciencias revisar los métodos clásicos de evaluación de sustancias químicas y recomendar cambios basados en los avances en el conocimiento de la Biología y las tecnologías emergentes. El trabajo de la comisión se ma-

terializó en un informe emitido en 2007 por el Consejo Nacional de Investigación de EE.UU. (NRC, *National Research Council*), titulado “*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*”. Este informe, que tiene por objeto modernizar la visión de los ensayos de toxicidad, propone un cambio de paradigma que proporcione las herramientas necesarias para hacer frente a los desafíos con los que se enfrenta actualmente la Toxicología (NRC, 2007; Bhattacharya *et al.*, 2011).

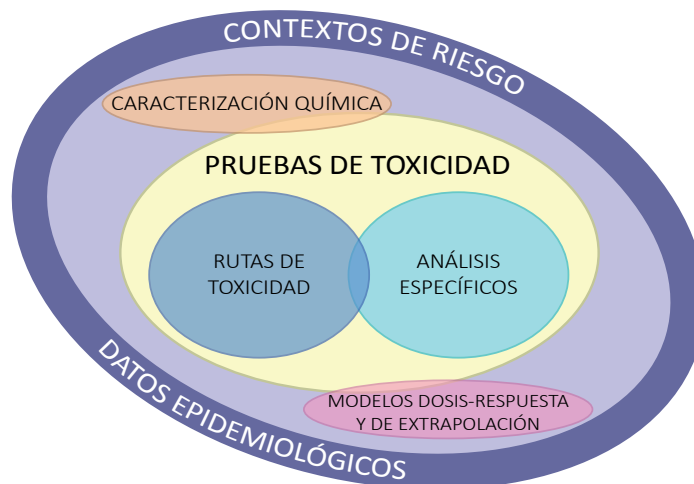


FIGURA 2. Componentes principales de los estudios toxicológicos: caracterización química de sustancias, estudio de las vías de toxicidad, aplicación de modelos dosis-respuesta y de extrapolación, y valoración de los datos procedentes de estudios epidemiológicos. Modificado de NRC, 2007.

El marco teórico de la nueva Toxicología tiene cuatro componentes principales: la caracterización química de sustancias, el estudio de las vías de toxicidad, la aplicación de modelos dosis-respuesta y de extrapolación, y la valoración de los datos procedentes de estudios epidemiológicos (Fig. 2). La parte más transformadora del nuevo paradigma se encuentra en la naturaleza de las pruebas de toxicidad propuestas y en la manera en que los resultados de éstas se interpretan en el contexto de la Biología moderna. En su desarrollo, áreas como la Toxicogenómica, la Bioinformática o la Toxicología computacional tienen un papel fundamental, de forma que la combinación de técnicas de alto rendimiento *in silico* con una creciente variedad de ensayos *in vitro* terminará por reducir notablemente el uso de animales en las pruebas de toxicidad, ofreciendo procedimientos de ensayo más rápidos y económicos, así como datos más precisos que permitan realizar mejores evaluaciones de los riesgos asociados a la exposición a agentes químicos (NRC, 2007; Andersen *et al.*, 2010; Krewski *et al.*, 2010).

En paralelo al trabajo desarrollado por la comisión de la Academia Nacional de Ciencias estadounidense, en la Unión Europea han tenido lugar cambios regulatorios basados en la misma filosofía que la del informe del NRC. En 2007 entra en vigor una ambiciosa normativa conocida como REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), encargada de regular en Europa la producción, la evaluación y el transporte de sustancias químicas. Parte de sus objetivos son mejorar la protección de la salud y el medio ambiente en materia de productos químicos y fomentar el uso de métodos alternativos para la valoración del peligro de las sustancias, con el fin de reducir el número de ensayos realizados con animales (EU, 2006). En el año 2009 se aprueba el nuevo Reglamento europeo sobre productos cosméticos, cuya reciente entrada en vigor prohíbe la realización de experimentos con animales en la Unión Europea para productos acabados, ingredientes o combinaciones de ingredientes cosméticos. Prohíbe asimismo la comercialización en el mercado europeo de productos cuya formulación final haya sido objeto de experimentación con animales (EU, 2009). Los intentos por limitar el empleo de animales en la investigación biomédica en general y en las pruebas de inocuidad de sustancias químicas en particular, también se han visto reflejados en la nueva Directiva relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (EU, 2010). Su texto insta a los Estados miembros a hacer uso, cuando sea posible, de un método o estrategia de ensayo científicamente satisfactorio que no conlleve la utilización de animales vivos, a reducir al mínimo el número de animales empleados en los proyectos y a eliminar o reducir cualquier posible dolor, sufrimiento o daño duradero a los animales. En definitiva, éste y los demás documentos ponen de manifiesto el gran protagonismo que pasan a tener los métodos alternativos en la investigación del siglo XXI, muy especialmente en el campo de la Toxicología.

1.1. MÉTODOS ALTERNATIVOS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Se definen como métodos alternativos todos aquellos procedimientos que pueden reemplazar completamente la necesidad de experimentación animal, reducir el número de animales requerido en un ensayo o refinar procedimientos ya existentes con el fin de disminuir el estrés o el sufrimiento infligido a éstos (Smyth, 1978). Este concepto se basa en el principio de las tres erres (3Rs) establecido por Russell y Burch, bajo el que subyace la filosofía de dispensar un trato humano a los animales de experimentación como prerequisite para la obtención de resultados científicamente válidos (Russell y Burch, 1959). Los campos más importantes en los que se sitúan los métodos alternativos son la educación, la investigación biomédica y la valoración de la toxicidad de los compuestos químicos (Repetto y Repetto, 1995). El conjunto de técnicas agrupadas bajo este término puede subdividirse en tres categorías, en función de la definición de cada una de las “Rs”:

- Métodos de reducción. Aplicación de estrategias que permitan disminuir el número de animales empleados en los ensayos, realizando diseños experimentales adecuados y estudios estadísticos apropiados.
- Métodos de refinamiento. Procedimientos que permitan mejorar las condiciones de vida de los animales de experimentación y la eficacia de los métodos aplicados.
- Métodos de reemplazo. Sustitución de ensayos llevados a cabo con vertebrados por métodos que empleen material no sensitivo, entendiendo por 'no sensitivo' los modelos computacionales, los ensayos *in vitro* con células, órganos o explantes y los ensayos con organismos menos desarrollados, como microorganismos o invertebrados.

Las alternativas de reducción y refinamiento están muy relacionadas con el perfeccionamiento del diseño experimental, de forma que la disponibilidad de información previa, la definición de los objetivos, y el correcto análisis de los resultados eviten la repetición innecesaria de experimentos. Las alternativas de reemplazo son las que representan verdaderamente el espíritu de las 3Rs. En la actualidad se dispone de un gran número de procedimientos que evitan el uso de animales de laboratorio, como los modelos computarizados de predicción, denominados *in silico*, capaces de relacionar cuantitativamente la estructura química y la actividad biológica de sustancias químicas (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Éstos ofrecen predicciones razonablemente fiables sobre la actividad biológica de los compuestos y se usan de manera habitual en el diseño de nuevos fármacos (Pearl *et al.*, 2001). También forman parte de los procedimientos de reemplazo los organismos de menor sensibilidad, como bacterias, plantas o invertebrados, ampliamente utilizados en los estudios de ecotoxicología, así como los métodos que aun haciendo uso de vertebrados (anfibios, reptiles o aves), lo hacen en etapas tempranas de su desarrollo (Repetto y Repetto, 1995; Castaño y Repetto, 2008).

Sin embargo, los representantes con mayor entidad dentro de las alternativas de reemplazo son los denominados ensayos *in vitro*, que contemplan el empleo de órganos, explantes, cultivos primarios y/o líneas celulares. Los ensayos *in vitro* son, por definición, una simplificación de la realidad, por lo que la información que son capaces de proporcionar es parcial en ocasiones. Por este motivo, la utilización de este tipo de sistemas requiere un importante esfuerzo en el desarrollo de ensayos suficientemente sensibles y que demuestren una buena correlación con las aproximaciones *in vivo* a las que pretenden sustituir (Garle *et al.*, 1994). Para ello resulta necesaria la aplicación de estrategias de ensayo inteligentes que, combinadas con las herramientas estadísticas apropiadas, garanticen la fiabilidad de los resultados obtenidos

(Fernández Freire *et al.*, 2009). Con independencia de las consideraciones éticas, los modelos *in vitro* presentan ciertas ventajas con respecto a los métodos *in vivo*, como la mayor homogeneidad del material empleado, un mejor control de los parámetros de experimentación, una menor duración de los ensayos, la rapidez en la obtención de los resultados o la necesidad de menores cantidades del compuesto a ensayar. Desde una perspectiva mecanicista resultan idóneos, ya que permiten abarcar un amplio número de respuestas (mutagenicidad, carcinogenicidad, mortalidad, etc.) sin tener en cuenta las interferencias debidas a los factores sistémicos, lo que facilita la elaboración de perfiles toxicológicos y el estudio de los mecanismos de acción (Repetto y Repetto, 2009).

I

1.2. LÍNEAS CELULARES COMO MODELO EN TOXICOLOGÍA

Aunque existe una amplia gama de sistemas experimentales para investigar las consecuencias derivadas de la exposición a productos químicos, los cultivos celulares constituyen probablemente el mejor compromiso entre la aproximación reduccionista *in vitro* y la predicción de la toxicidad en humanos (Eisenbrand *et al.*, 2002; Gennari *et al.*, 2004). La adaptación de técnicas procedentes del campo de la Biología celular no es una práctica novedosa en Toxicología, ya que lleva utilizándose de manera más o menos extensiva desde los años 80 (Zucco *et al.*, 2004). Esta larga trayectoria hace posible que hoy en día contemos con una amplia variedad de metodologías que pueden aplicarse a diferentes tipos de estudios toxicológicos.

Dentro de los distintos tipos de cultivo, las líneas celulares establecidas representan un modelo alternativo atractivo que posibilita la obtención de resultados muy reproducibles. Las células inmortalizadas ofrecen gran homogeneidad muestral y son de fácil mantenimiento y manipulación, lo que permite tener bajo control todas las condiciones de crecimiento del cultivo (temperatura, pH, humedad, composición del medio de cultivo) y realizar diseños experimentales muy versátiles que combinen la evaluación de grandes rangos de concentración con múltiples tiempos de exposición (Austin y Mothersill, 2003; Barile, 2008). Como contrapartida, estos cultivos con crecimiento ilimitado terminan por perder algunas de las características diferenciales del tejido de origen por un proceso de desdiferenciación, lo que afecta fundamentalmente a su metabolismo secundario (Anderson *et al.*, 1998; Guillouzo, 1998).

Los estudios llevados a cabo en sistemas celulares suponen una aproximación en la que la unidad de estudio es la célula en lugar del organismo. De este modo, los efectos tóxicos que se producirían en un animal completo se transforman en alteraciones de las funciones celulares básicas (Walum, 1998). A pesar de que no puede realizarse una extrapolación directa entre los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* y los organismos completos, cada vez son más numerosos los estudios que muestran una buena correlación entre pruebas de citotoxicidad basal y valores de toxicidad aguda *in vivo* (Walum, 1998; ECVAM, 2002). Así, los

valores de concentración efectiva media (EC50, *Effective Concentration 50*), concentración que produce el 50% del efecto observado, se correlacionan adecuadamente con los datos de LD50 obtenidos en ensayos de toxicidad aguda con roedores (Clemenson *et al.*, 2002; Gennari *et al.*, 2004; Leist *et al.*, 2008). Esto se debe a que, a pesar de su alto grado de organización estructural y funcional, los organismos multicelulares reaccionan a los cambios ambientales en última instancia a nivel de las células, que son las unidades fundamentales de organización biológica.

Las líneas celulares de mamífero son las más utilizadas en la actualidad en las pruebas de citotoxicidad (Zucco *et al.*, 2004) y diversos trabajos enfatizan la importancia de las de líneas de origen humano como herramienta para estudiar las relaciones dosis-respuesta, definir rutas de daño y dilucidar los mecanismos de acción tóxica de sustancias potencialmente nocivas para la salud humana (NRC, 2007; Andersen *et al.*, 2010; Bhattacharya *et al.*, 2011).

Se define citotoxicidad como los efectos adversos o interferencias con estructuras y/o propiedades esenciales para la supervivencia, la proliferación y/o la función celular, incluyendo la integridad de la membrana plasmática y del citoesqueleto, el metabolismo, la síntesis y degradación de constituyentes celulares, la regulación de iones y la división celular (Seibert *et al.*, 1996). Algunas de estas dianas resultan ser más susceptibles que otras ante el daño producido por la exposición a xenobióticos, e incluso la sensibilidad de determinados parámetros puede variar de forma significativa dependiendo del tipo celular, por lo que su adecuada monitorización resulta fundamental en este tipo de estudios. En cualquier caso, se trata de estructuras o procesos presentes en todos los tipos celulares y que participan en las funciones vitales de las células, de tal modo que su alteración puede acarrearles graves consecuencias.

Atendiendo a la especificidad del daño, los procesos citotóxicos pueden clasificarse en tres tipos principales (Ekwall, 1995; Walum, 1998). La citotoxicidad basal es la forma más elemental de toxicidad celular, implicando la alteración de al menos uno de los procesos o estructuras esenciales de la célula y cuya sensibilidad es similar en todos los tipos celulares, independientemente de su origen. La citotoxicidad selectiva refleja un daño organoespecífico como consecuencia de procesos de biotransformación, unión específica a receptores o mecanismos específicos de incorporación, de forma que determinados tipos celulares con fenotipos más diferenciados muestran una mayor sensibilidad a los efectos de un compuesto tóxico. La toxicidad específica de función celular afecta a procesos intercelulares que no tienen por qué ser vitales para las células pero sí lo son para el organismo completo, como por ejemplo la producción y/o liberación de hormonas u otras moléculas de señalización. La mayoría de compuestos químicos reflejan su toxicidad a nivel basal, ya que en última instancia las alteraciones de las funciones celulares tienen su origen en interacciones inespecíficas

del compuesto con las diferentes estructuras subcelulares (Ekwall, 1995; Eisenbrand *et al.*, 2002). Esta circunstancia sitúa a la citotoxicidad basal como punto de referencia esencial en los estudios de toxicidad.

I El objetivo de las pruebas de toxicidad con líneas celulares no queda limitado al estudio de los casos extremos de toxicidad aguda. Desde el punto de vista toxicológico, la valoración de los efectos adversos, entendidos como los cambios bioquímicos o morfológicos que tienen lugar en una célula como consecuencia del daño producido por un agente nocivo y que se traducen en un deterioro de su capacidad funcional, resultan de gran interés a la hora de determinar dianas subcelulares preferentes, definir perfiles toxicológicos y relaciones de dosis-dependencia, así como establecer los mecanismos de muerte celular. Sin embargo, a la hora de conseguir información sobre la actividad biológica de un compuesto y determinar su mecanismo de acción, resultan interesantes aproximaciones en las que las condiciones de exposición no conduzcan al deterioro generalizado de las funciones celulares, de forma que la ausencia de efectos tóxicos evidentes permita valorar las respuestas adaptativas de las células (Keller *et al.*, 2012). Estas aproximaciones son, además, mucho más realistas, dado que en el contexto de la exposición ambiental a agentes químicos rara vez nos encontramos ante situaciones equiparables a una intoxicación aguda. Por tanto, el estudio de los mecanismos de adaptación a ambientes estresantes es una buena base para abordar los problemas de salud ambiental y realizar una evaluación adecuada del riesgo toxicológico (Roggen, 2011).

Las células responden a los factores exógenos, como los xenobióticos, el calor o la radiación, a través de una serie de rutas específicas de respuesta a estrés que tratan de mitigar el daño y mantener o restablecer la homeostasis. Estas vías están presentes en todos los tipos de células y se activan a niveles de exposición significativamente más bajos que los que causan lesiones celulares observables, por lo que pueden considerarse como la primera señal de toxicidad y utilizarse como un marcador temprano de potenciales estados patológicos (Kültz, 2005; Simmons *et al.*, 2009). En este sentido, las nuevas tendencias en Toxicología se mueven en la dirección de acercarse a un enfoque basado en el estudio de las perturbaciones de esas rutas, utilizando ensayos *in vitro* bien diseñados. El objetivo de los estudios sería determinar las denominadas “rutas de toxicidad”, que son en último término las vías de señalización que se activan ante la alteración de la homeostasis celular y que conducen a efectos nocivos si la duración o la intensidad del estímulo que las activa es excesiva (Boekelheide y Andersen, 2010; NRC, 2007) (Fig. 3).

Las rutas principales de respuesta a estrés que se activan para mantener la homeostasis o tomar decisiones específicas de destino celular, como la apoptosis, son relativamente limitadas. Algunos ejemplos son la respuesta de estrés oxidativo, la respuesta de choque térmico, el

estrés del retículo endoplásmico o la respuesta de daño al ADN (Simmons *et al.*, 2009). Todas ellas presentan un patrón común que consiste en un sensor que detecta la señal, un transductor que la amplifica e integra y un efector, normalmente un factor de transcripción, que ejecuta la respuesta modificando la actividad transcripcional de los genes. De forma general, los sensores y los efectores son característicos de una vía, mientras que los transductores pueden ser comunes a varias de ellas, de manera que un mismo estímulo puede activar simultáneamente varias rutas (Kültz, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2011). El estudio de la variación de la expresión génica de sensores y efectores puede ayudar a caracterizar la vía que preferentemente activó un agente concreto, representando una herramienta útil a la hora de determinar su posible mecanismo de acción.

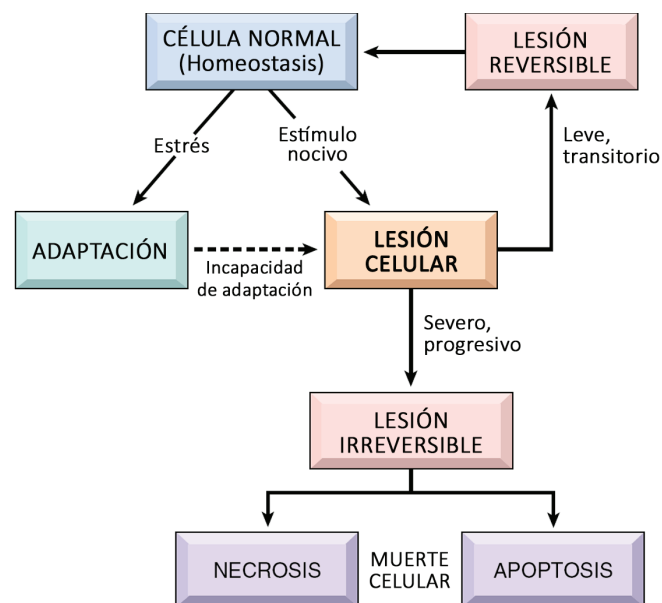


FIGURA 3. Etapas en la respuesta celular a estrés y a los estímulos nocivos.
Modificado de Kumar *et al.*, 2009.

Es importante señalar que, mientras la citotoxicidad basal no difiere significativamente entre unos tipos celulares y otros (Ekwall y Ekwall, 1988; Ekwall, 1995), la capacidad de respuesta a estrés depende de la expresión de múltiples factores, siendo por tanto específica de cada tipo celular. En este sentido, la intensidad y el alcance de las respuestas pueden variar entre células con fondos genéticos distintos o verse afectados por las características físico-químicas del entorno o el momento del ciclo celular de una célula en particular (Kültz, 2005). Sin embargo, se trata de procesos muy conservados que se activan por una amplia variedad de factores de estrés y que afectan a procesos celulares ubicuos en todos los tipos de células. Desde una

perspectiva toxicológica, estas dos características convierten a las rutas de respuesta a estrés en una diana de estudio muy interesante. Además, su activación ante condiciones de exposición no severas representa una señal temprana de daño, indicativa de posibles lesiones celulares irreversibles en caso de verse incrementada la concentración o el tiempo de exposición al agente nocivo. Podrían ser, por tanto, un factor clave que delimite el nivel sin efecto observable (NOEL; *No Observed Effect Level*) (Simmons *et al.*, 2009) (Fig. 4).

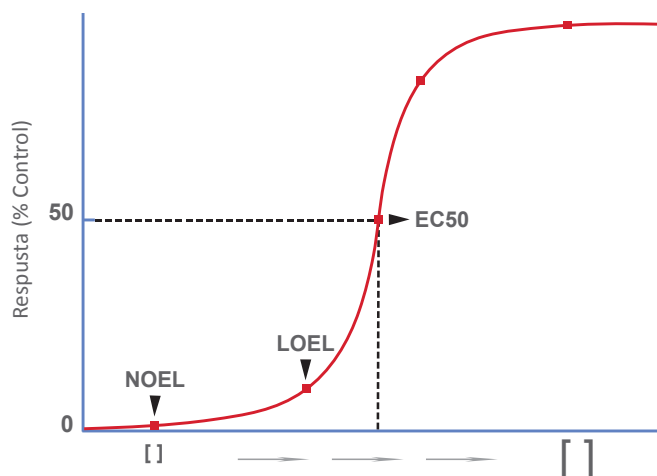


FIGURA 4. Curva dosis-respuesta estándar. Se representan parámetros de relevancia toxicológica, como el nivel sin efecto observado (NOEL, *No Observed Effect Level*), el menor nivel con efecto observable (LOEL, *Least Observable Effect Level*) y la concentración efectiva que causa el 50% del efecto máximo (EC50, *Effective Concentration 50*).

1.3. CRITERIOS GENERALES SOBRE EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN TOXICOLOGÍA

La evaluación toxicológica de una sustancia se fundamenta en la observación de los efectos adversos que produce, por lo que resulta esencial disponer de métodos que eviten que dichos efectos pasen inadvertidos. En este sentido, la experimentación toxicológica se centra en la detección y cuantificación de las alteraciones inducidas por los agentes tóxicos, denominándose biomarcadores los parámetros en base a los que se determinan las modificaciones producidas a nivel génico, molecular, bioquímico o celular.

Los planteamientos en Toxicología experimental están orientados hacia la identificación de las estructuras químicas responsables de los efectos, el estudio de las condiciones que los provocan y la determinación de los mecanismos de interacción de esas sustancias con los

distintos procesos biológicos. La configuración de un buen diseño experimental supone uno de los puntos de mayor importancia a la hora de estimar la toxicidad de una sustancia. De manera general, éste debe atender al cumplimiento de cuatro objetivos principales (Bello y López de Cerain 2001):

- Definir la toxicidad intrínseca del tóxico.
- Establecer el peligro que representa la exposición al mismo.
- Averiguar la presencia de dianas o receptores específicos.
- Conocer los mecanismos implicados en sus efectos fisiopatológicos.

I

Para diseñar cualquier tipo de experimento en Toxicología es conveniente ajustarse a una serie de criterios de trabajo (Castaño y Repetto, 2008; Repetto y Repetto, 2009):

- Conocimiento de las propiedades físico-químicas de la sustancia a ensayar. Para que un agente químico produzca un efecto debe interaccionar de alguna manera con el sustrato biológico, por lo que resulta esencial tener en consideración parámetros como la solubilidad, la polaridad o la capacidad del compuesto de formar agregados.
- Modelo biológico. Resulta esencial realizar una elección apropiada del material sobre el que se van a desarrollar los experimentos, pudiéndose elegir entre multitud de sistemas tanto *in vivo* como *in vitro*. En el caso concreto de las líneas celulares, es interesante tener en cuenta aspectos como el origen de las células, su disponibilidad, las características de crecimiento del cultivo y las necesidades específicas de cada tipo celular.
- Dosis a ensayar. Los efectos observados dependen de la concentración del tóxico, existiendo un nivel por debajo del cual no es posible detectar el efecto, un nivel por encima del cual aparecen efectos significativos en todos los parámetros analizados y niveles intermedios capaces de provocar efectos sólo en algunos parámetros concretos.
- Duración del experimento. Los efectos pueden aparecer de forma inmediata como consecuencia de la exposición a niveles elevados de un agente químico. Sin embargo, en ocasiones estos efectos pueden aparecer de forma retardada o manifestarse como resultado de la exposición continuada a pequeñas cantidades del agente.

En relación con estos principios generales de abordaje metodológico hay que señalar dos observaciones (Bello y López de Cerain, 2001): 1) las pruebas de laboratorio han de ser contempladas desde un punto de vista cuantitativo, aun cuando la prueba sea de carácter cualitativo, resultando fundamental el empleo de herramientas estadísticas para garantizar la validez de los datos obtenidos; 2) la interpretación de los resultados debe realizarse cuidadosamente, teniendo en consideración el carácter multidisciplinar de toda evaluación toxicológica.

Otro aspecto importante a tener en cuenta cuando se realizan los diseños experimentales son los biomarcadores de toxicidad, que deben seleccionarse antes de comenzar los experimentos teniendo en consideración tanto la secuencia habitual de modificación de los indicadores como ciertas características que posibilitan su correcta detección (Repetto y Repetto, 2009). Por ejemplo, la variación del estado redox de una célula por acción de un compuesto puede detectarse en pocas horas, mientras que los efectos sobre el ciclo celular no pueden valorarse hasta transcurrido un periodo de tiempo mayor.

Distintas directrices recogen las dianas celulares prioritarias para llevar a cabo una evaluación *in vitro* eficaz de la citotoxicidad de productos químicos (ECVAM, 2002; NIH, 2003). En todas ellas se propone un abordaje experimental escalonado en el cual, una vez seleccionado adecuadamente el tipo celular y el tiempo de exposición, se han de emplear métodos que analicen procesos tales como la integridad de membranas, el citoesqueleto, el metabolismo y la proliferación celular (Fig. 5). Es evidente que la relevancia de la información obtenida a partir de estos ensayos depende en gran medida del sistema experimental y de las técnicas utilizadas (Gómez-Lechon y Castell, 1995). En este sentido, nuestra experiencia previa determinando la citotoxicidad de contaminantes ambientales de diversos grupos químicos (Fernández Freire *et al.*, 2005, 2008; Labrador *et al.*, 2007; Pérez Martín *et al.*, 2008) nos ha demostrado que la mejor aproximación a este tipo de estudios es la combinación de ensayos bioquímicos y morfológicos, que ofrecen información complementaria y consistente sobre el estado real de los cultivos analizados (Fernández Freire *et al.*, 2009; Hazen *et al.*, 2010).

La evaluación de procesos bioquímicos mediante ensayos de citotoxicidad cuenta en la actualidad con un amplio número de ensayos disponibles. Por un lado, la inhibición de la proliferación celular se puede determinar mediante la cuantificación del número de células, la cantidad de proteína total y/o el contenido de ADN. Por otro lado, la viabilidad celular puede determinarse mediante marcadores metabólicos, como la reducción mitocondrial de sales de tetrazolio, o a partir de parámetros relacionados con la integridad de las membranas, tales como la captación de rojo neutro, la exclusión de azul tripán o la pérdida de adhesión celular (Repetto *et al.*, 2008b; Kim *et al.*, 2009; Repetto y Repetto, 2009). El desarrollo de sistemas

de cuantificación espectrofotométrica de alta capacidad adaptados al trabajo con cultivos celulares en placas multipocillo ha agilizado sobremanera la medida de todos estos parámetros, ofreciendo resultados rápidos y fiables.

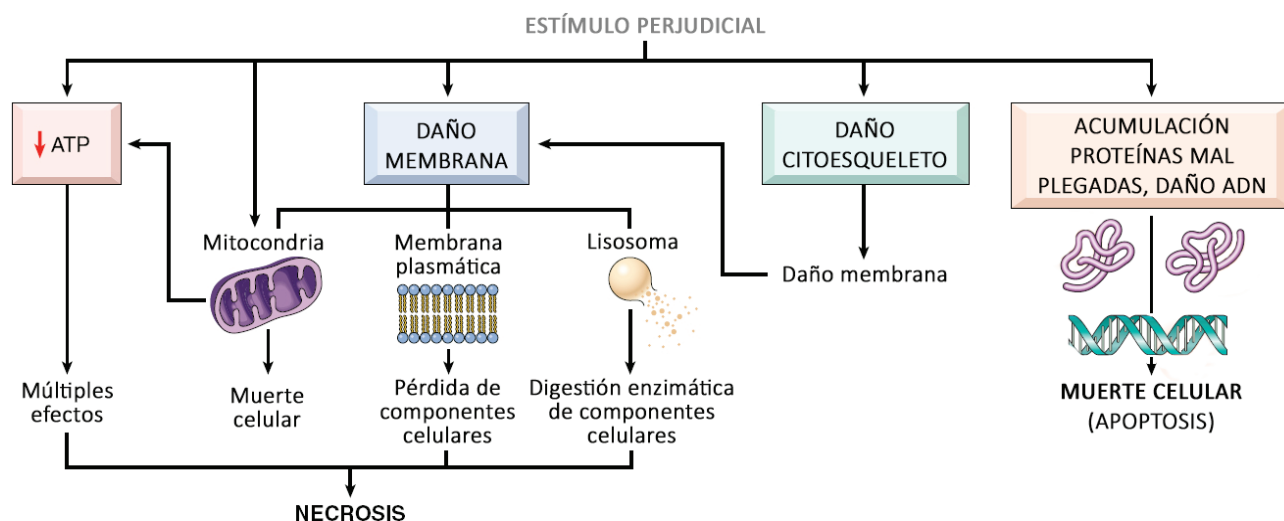


FIGURA 5. Principales dianas celulares en la evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de productos químicos. Modificado de Kumar *et al.*, 2009.

En cuanto a las pruebas morfológicas, el empleo de cultivos celulares permite llevar a cabo análisis muy detallados de múltiples procesos y estructuras subcelulares, aunque resulta necesario destacar que la calidad y la cantidad de la información obtenida a partir de esta clase de parámetros depende en gran medida del tipo celular con el que se trabaje y de las técnicas de microscopía disponibles (Hazen *et al.*, 2010). Los nuevos métodos de marcaje de células vivas, junto con el desarrollo de microscopios automatizados o confocales y de las técnicas de análisis de imagen, han propiciado un nuevo auge de la microscopía óptica, a la cual ya se le saca partido en campos como el desarrollo de nuevos fármacos (Stephens y Allan, 2003; Lang *et al.*, 2006; Pepperkok y Ellenberg, 2006).

En los últimos años, impulsadas por los avances tecnológicos derivados del Proyecto Genoma Humano, se han desarrollado nuevas metodologías denominadas genéricamente “-ómicas” que han marcado nuevas fronteras en la investigación biomédica. En este sentido, la Toxicología se ha beneficiado extraordinariamente del desarrollo reciente de la tecnología de *microarrays* de ADN, herramienta muy potente que permite investigar de forma amplia las respuestas celulares a través de los cambios transcripcionales que tienen lugar en los genes. En el campo de la Toxicogenómica, la identificación de genes proporciona una nueva forma de

entender los efectos deletéreos provocados por los agentes tóxicos y constituye la piedra angular de las futuras estrategias de prevención de riesgos (Nuwaysir *et al.*, 1999; Cunningham, 2006). Cabe señalar que estas técnicas forman parte de los denominados métodos de cribado de alto rendimiento (u-HTS, *ultra-high throughput screening methods*) y que, como tales, proporcionan una formidable cantidad de información, lo que requiere un complejo procesamiento informático posterior que en ocasiones resulta difícil de interpretar.

I La correcta combinación de técnicas toxicológicas clásicas con los métodos *in vitro* e *in silico* y las novedosas metodologías -ómicas constituye en la actualidad la mejor estrategia para hacer frente a los desafíos con los que se enfrenta la Toxicología moderna, que debe conciliar la urgente necesidad de evaluar el creciente número de sustancias químicas presentes en nuestro entorno con las exigencias relativas a la reducción del número de animales de experimentación y la obtención de datos consistentes sobre los efectos nocivos de estas sustancias (Leist *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2010; Liebsch *et al.*, 2011).

De los miles de productos que entran constantemente en el medio ambiente como consecuencia de la actividad humana, los compuestos orgánicos persistentes (COPs) y los metales pesados eran considerados hasta hace unos años contaminantes prioritarios en lo que al riesgo para la salud y el medio ambiente se refiere. Sin embargo, el reciente desarrollo e implantación de métodos de análisis más sensibles ha permitido alertar de la presencia de otros contaminantes potencialmente peligrosos y que han sido definidos como “emergentes” por la Organización Mundial de la Salud, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos y la Comisión Europea.

2. CONTAMINANTES EMERGENTES

Se definen como emergentes todos aquellos contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales y que hasta hace poco no estaban incluidos en los programas de vigilancia ambiental (Petrovic *et al.*, 2008). Se trata de compuestos de naturaleza química muy variada y que forman parte de una amplia variedad de productos de uso diario, con aplicaciones tanto industriales como domésticas, entre los que se incluyen fármacos y productos de cuidado personal, drogas de abuso, pirorretardantes bromados, compuestos perfluorados, parafinas cloradas, ésteres de ftalatos y nanomateriales (Lapworth *et al.*, 2012; Stuart *et al.*, 2012). Estos compuestos se encuentran ampliamente diseminados en el ambiente, siendo especialmente alarmante su detección en fuentes de abastecimiento de agua, aguas subterráneas e incluso aguas de consumo. Este hecho los ha convertido en motivo de preocupación para la comunidad científica y los organismos reguladores (Eggen *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2010), hasta el punto de que algunos ya han sido incluidos en los listados de sustancias prioritarias.

El impacto que tienen estos compuestos sobre la salud pública y el medio ambiente se debe en gran medida a dos factores: a) su elevada producción y los altos niveles de consumo, características que hacen que no necesiten ser persistentes para ocasionar efectos negativos por ser introducidos de manera continua en nuestro entorno; y b) su incompleta eliminación en las estaciones depuradoras de aguas residuales (Petrovic, 2003). En la mayoría de las ocasiones estos compuestos han sido diseñados para tener una larga vida media y, en el caso de los fármacos, para ser degradados por rutas metabólicas muy específicas. De hecho, estudios recientes realizados en plantas depuradoras antes y después de los tratamientos demuestran que los métodos de eliminación convencionales no siempre son eficaces e incluso pueden producir la acumulación de alguno de estos compuestos (Miège *et al.*, 2008).

A pesar de los importantes esfuerzos que se están llevando a cabo, actualmente se cuenta con un número bastante limitado de datos toxicológicos y ecotoxicológicos para la mayoría de los contaminantes catalogados como emergentes (Petrovic, 2003; Petrovic *et al.*, 2008). Esto dificulta considerablemente la posibilidad de realizar una valoración real del riesgo que a medio y largo plazo supone su presencia en los ecosistemas, así como de los problemas derivados de la exposición continua e involuntaria a la que los seres humanos se encuentran sometidos. Por ello, resulta esencial obtener información adecuada acerca de este nuevo problema de contaminación ambiental, con el fin de que los contaminantes emergentes puedan ser incluidos en los programas de vigilancia toxicológica. Los aspectos que requieren una investigación más urgente son el estudio de las fuentes de entrada en el medio ambiente y las vías de exposición en humanos, los niveles en agua, aire y suelos, su destino en el medio ambiente y datos acerca de su potencial toxicidad (Barceló y López de Alda, 2008; Petrovic *et al.*, 2008). En opinión de algunos científicos la problemática ambiental asociada a estos compuestos puede alcanzar dimensiones comparables a la provocada por el DDT, los bifenilos policlorados, las dioxinas y otros contaminantes clásicos.

Las investigaciones realizadas en los últimos años han terminado por tener una importante repercusión en el marco legal, de forma que compuestos que hasta el momento habían pasado inadvertidos aparecen ya indexados en las listas de sustancias de muy alta preocupación. Sin embargo, el control al que está sometido este grupo de productos todavía se encuentra muy por debajo de los niveles de regulación existentes para otros contaminantes más clásicos. Entre las clases de contaminantes emergentes que demandan una atención más urgente, debido a su gran ubicuidad y a la falta de información sobre sus efectos tóxicos, se encuentran los plastificantes, los fármacos y productos de cuidado personal, y los tensioactivos perfluorados. Los compuestos seleccionados para la realización del presente trabajo pertenecen a estos tres grandes grupos y la información más relevante sobre los mismos se detalla a continuación.

2.1. PLASTIFICANTES. EL DI (2-ETILHEXIL) FTALATO

I

Los plastificantes son compuestos inertes de baja volatilidad que se incorporan a distintos materiales, plástico y hormigón principalmente, para incrementar su flexibilidad, elasticidad, resistencia y/o maleabilidad. Los ésteres de ftalato son los plastificantes de uso industrial más utilizados, con una cuota de mercado del 70% y una producción mundial de 3 millones de toneladas al año (Hartemann *et al.*, 2011). Como consecuencia, se hallan entre los contaminantes ambientales más abundantes y extendidos. Concretamente, el di (2-etilhexil) ftalato (DEHP), también conocido como dioctil ftalato, es el plastificante más usado en el mundo y también el más empleado en la fabricación de dispositivos de uso médico (FDA, 2002; NTP-CERHR, 2006). Aunque su aplicación más destacada es la de aditivo del policloruro de vinilo (PVC), también aparece formando parte de productos cosméticos, envases alimentarios, embalajes, calzado, cables eléctricos, pavimentos y juguetes infantiles, entre otros (ATSDR, 2002b; Horn *et al.*, 2004; Lopez-Espinosa *et al.*, 2007) (Fig. 6).



FIGURA 6. Ejemplos de materiales plásticos que incorporan DEHP en su composición. De izquierda a derecha, bolsas para la transfusión de sangre, botellas y cables eléctricos.

El DEHP se lixivia con facilidad de los materiales plásticos que lo contienen, ya que no está químicamente enlazado a su matriz polimérica, lo que se traduce en la exposición constante de la población general a través de la ingesta, la inhalación y la absorción dérmica (Heudorf *et al.*, 2007). De hecho, este compuesto y sus metabolitos se han detectado en multitud de muestras de origen humano, entre las que se incluyen plasma, orina, leche materna, sangre de cordón umbilical y líquido amniótico (Silva *et al.*, 2004; Högberg *et al.*, 2008; Wittassek *et al.*, 2011), lo que sugiere que la exposición a este plastificante puede comenzar ya desde la etapa intrauterina.

Debido a su presencia ubicua en el medio acuático y terrestre y a las posibles consecuencias adversas para la salud humana y ambiental, el DEHP ha sido objeto de extensos estudios

toxicológicos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Caldwell, 2012; Rusyn y Corton, 2012; Magdouli *et al.*, 2013). Existen evidencias suficientes de que la administración de este compuesto a roedores puede relacionarse directamente con efectos tóxicos en hígado y riñón (Woodward, 1990; David *et al.*, 2000a,b; Kamijo *et al.*, 2007), así como en aparato respiratorio (Magliozzi *et al.*, 2003), aunque lo que ha despertado mayor interés es la posible asociación entre la exposición repetida a DEHP y los efectos perjudiciales para la reproducción y el desarrollo (Latini *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2008; Lyche *et al.*, 2009). A pesar de que no se dispone de información suficiente en humanos, los datos existentes demuestran la capacidad del DEHP de alterar parámetros reproductivos actuando como un alterador endocrino (Lovekamp-Swan y Davis, 2003; Akingbemi *et al.*, 2004; Sharpe y Irvine, 2004), evidencias que han llevado a considerarlo un posible tóxico para la reproducción y a incluirlo en el listado de sustancias de muy alta preocupación de la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA, *European Chemicals Agency*) (ECHA, 2008).

El riesgo carcinogénico del compuesto, que ha sido motivo de controversia debido a la incertidumbre derivada de la extrapolación de datos desde roedores a humanos (Ito y Nakajima, 2008), también ha sido objeto de considerable atención. A pesar de la falta de evidencias epidemiológicas, el DEHP ha sido clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) como posible carcinógeno para los humanos (Grupo 2B) (IARC, 2012).

En los últimos años, una serie de hallazgos epidemiológicos y experimentales han planteado nuevas preocupaciones sobre los posibles efectos adversos para la salud humana asociados con la exposición a DEHP. Al igual que en el caso de otros contaminantes ambientales, se ha documentado que este plastificante puede tener efectos sobre la homeostasis metabólica, aumentando el riesgo de padecer obesidad y diabetes tipo II, relacionada esta última con la inducción de resistencia a insulina (Hatch *et al.*, 2010; Svensson *et al.*, 2011; Tang-Péronard *et al.*, 2011). En cualquier caso, sigue existiendo una gran controversia acerca del perfil toxicológico del DEHP, su modo de acción y los posibles riesgos para la salud humana y la de los ecosistemas.

2.2. FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL. EL TRICLOSÁN

De todos los contaminantes emergentes, los que posiblemente han sido objeto de más estudios en los últimos años son los fármacos y productos de cuidado personal (PPCPs, *Pharmaceutical and Personal Care Products*). La presencia en el medio ambiente de este tipo de compuestos pasó desapercibida hasta la publicación a finales de los años 90 de un trabajo pionero de Daughton y Ternes, en el que quedó patente que el problema de la contaminación por fármacos alcanzaba dimensiones comparables al de los pesticidas organoclorados (Daughton y Ternes, 1999).

Dentro del grupo de los PPCPs encontramos medicamentos de familias muy diversas, como antiinflamatorios, antiepilépticos, antibióticos y β -bloqueantes, así como sustancias empleadas como aditivos en cosméticos, productos de higiene personal y alimentos (Daughton y Ternes, 1999; Jones *et al.*, 2001). Aunque la mayoría de los PPCPs están diseñados para ejercer acciones concretas sobre dianas terapéuticas específicas y muchos de ellos resultan ser sustancias de baja toxicidad según los análisis tradicionales, en la mayoría de las ocasiones se desconocen sus mecanismos de acción tóxica, su potencial toxicidad para órganos u organismos no diana y, especialmente, los problemas derivados de la exposición crónica a la que estamos sometidos (Fent *et al.*, 2006; Brausch *et al.*, 2012). En cuanto a las vías de exposición a este tipo de compuestos es importante señalar que, en lo que a la administración voluntaria se refiere, la población general está cada vez más sensibilizada con el consumo responsable de fármacos, quedando éste parcialmente restringido por la prescripción facultativa. Esta situación no es aplicable a los productos de cuidado personal, en cuyas formulaciones encontramos gran cantidad de aditivos químicos a los que nos exponemos diariamente por múltiples vías y, en la mayoría de las ocasiones, de forma totalmente inadvertida. También es importante señalar que, fruto de ese uso continuado, estas sustancias se detectan en el ambiente con más frecuencia y en concentraciones mayores que los fármacos, representando el grupo de contaminantes ambientales más comúnmente detectado en aguas superficiales en el mundo (Ternes *et al.*, 2004; Peck, 2006; Brausch y Rand, 2011).

El 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol, conocido comercialmente como Irgasan® DP-300 o triclosán (TCS), es un agente antimicrobiano de amplio espectro que se ha venido utilizando como conservante de forma habitual durante los últimos 40 años, estimándose su consumo global en 1500 toneladas anuales (Singer *et al.*, 2002). Aparece en la composición de muchos productos cosméticos de uso cotidiano, como jabones, desodorantes, colutorios y dentífricos (Jones *et al.*, 2000; Tan, 2002; Dann y Hontela, 2011), aunque también se utiliza como antiséptico en ropa deportiva, envases para alimentos, dispositivos de uso médico y juguetes, entre otros (Perencevich *et al.*, 2001; EPA, 2010; Windler *et al.*, 2013) (Fig. 7).

A pesar de que en los procesos de depuración se elimina entre el 80 y 90% (Bester, 2005; Ricart *et al.*, 2010), el volumen de TCS vertido al medio ambiente es tan importante y constante que este compuesto se ha detectado en infinidad de compartimentos ambientales, siendo uno de los contaminantes más frecuentes en ecosistemas acuáticos (Kolpin *et al.*, 2002; Capdevielle *et al.*, 2008; Dann y Hontela, 2011). Su presencia es también habitual en tejidos animales de distintas especies, especialmente peces (Adolfsson-Erici *et al.*, 2002; Fair *et al.*, 2009; Dann y Hontela, 2011), así como en muestras de origen humano, entre las que se incluyen orina, sangre y leche materna (Allmyr *et al.*, 2006, 2008; Dayan, 2007; Calafat *et al.*, 2008).

Su condición de contaminante ubicuo se ha convertido en motivo de gran preocupación para la comunidad científica, lo que ha derivado en los últimos años en un creciente número de estudios acerca de sus propiedades tóxicas. Dado que los ecosistemas acuáticos constituyen el principal destino del TCS liberado al medio ambiente, gran parte de estos estudios se han llevado a cabo en protistas, invertebrados acuáticos y peces. Se sabe que este compuesto presenta una elevada toxicidad para los organismos que habitan este tipo de ecosistemas, especialmente para las algas verdes (Tatarazako *et al.*, 2004), habiéndose publicado asimismo diversos trabajos que demuestran que tampoco es inocuo para otros grupos taxonómicos, entre los que se incluyen plantas superiores (Dann y Hontela, 2011; Herrero *et al.*, 2012).



FIGURA 7. Ejemplos de productos de uso cotidiano que contienen triclosán. De izquierda a derecha, pasta dentífrica, juguetes infantiles y jabón de manos.

Los efectos tóxicos del TCS en mamíferos se han evaluado principalmente en roedores, para los que se ha determinado una baja toxicidad aguda con valores de LD50 superiores a 1 g/Kg (Lyman y Furia, 1969; Kanetoshi *et al.*, 1992). En cuanto a los efectos adversos asociados a exposiciones prolongadas al compuesto, se ha llamado la atención sobre su posible carcinogenicidad. A pesar de no contar con evidencias acerca de la genotoxicidad y/o mutagenicidad del TCS según los ensayos clásicos (Bhargava y Leonard, 1996; Rodricks *et al.*, 2010), se ha podido observar el desarrollo de adenomas y carcinomas hepáticos en ensayos crónicos con ratones (Rodricks *et al.*, 2010) y, asociados a su posible papel como disruptor endocrino, efectos sobre la proliferación celular en distintos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Darbre, 2006; Gee *et al.*, 2008; Rodríguez y Sanchez, 2010). En este sentido, cabe señalar que la gran similitud estructural del TCS con la hormona tiroidea o con conocidos alteradores endocrinos como el bisfenol A se ha considerado una importante característica a tener en cuenta con respecto a la potencial capacidad del compuesto para alterar la homeostasis hormonal (Crofton *et al.*, 2007; Allmyr *et al.*, 2008). Así, múltiples estudios han demostrado que este bactericida tiene efectos sobre el sistema endocrino de animales de

distintas especies a concentraciones de relevancia ambiental (Foran *et al.*, 2000; Rodríguez y Sanchez, 2010; Dann y Hontela, 2011). Sin embargo, se desconocen hasta la fecha los mecanismos subyacentes a estos efectos, así como el modo de acción del compuesto más allá de lo descrito en bacterias.

2.3. TENSIOACTIVOS PERFLUORADOS. EL ÁCIDO PERFLUOROOCTANOICO

I Los tensioactivos perfluorados son compuestos orgánicos emergentes que han sido empleados masivamente durante los últimos 50 años, debido a su elevada resistencia mecánica y a su capacidad de repeler el agua, los lípidos y el polvo. Se utilizan en detergentes, disolventes, revestimientos plásticos y en la industria del teflón y el Gore-Tex® (Banks *et al.*, 1994; Kissa, 2001) (Fig. 8). Una de las características más importantes de estas moléculas es la gran estabilidad de sus enlaces C-F, que les confiere una elevada resistencia a la hidrólisis, la fotólisis y la degradación microbiana (Banks *et al.*, 1994). Esta inusual característica físico-química convierte a estas sustancias en difícilmente biodegradables, lo que plantea amenazas tanto para el medio ambiente como para la salud humana (EPA, 2002).

Debido a su amplia distribución ambiental y a su elevada capacidad de bioacumulación, los tensioactivos perfluorados que suscitan mayor interés y preocupación son el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA) (EPA, 2009). A pesar de las llamadas de atención sobre el alcance de la contaminación por este tipo de compuestos, la producción mundial de PFOA alcanzaba en 2004 la cantidad de 1200 toneladas anuales, convirtiéndose así en la sustancia perfluoroalquilada más común en el mercado (Lau *et al.*, 2007). Desde entonces han sido muchos los esfuerzos encaminados a reducir las emisiones de este compuesto, que ha terminado por ser incluido en el listado de sustancias de muy alta preocupación de la ECHA al ser considerado persistente, bioacumulable y tóxico (PBT), así como tóxico para la reproducción (ECHA, 2013).

El PFOA se ha podido detectar en multitud de muestras ambientales (Buck *et al.*, 2011; Zareitalabad *et al.*, 2013), en tejidos de animales de todo el mundo (Kannan *et al.*, 2001, 2002; Giesy y Kannan, 2002) y en el suero de la mayor parte de la población humana (Kannan *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2005; Calafat *et al.*, 2006). Los estudios indican que la vía más frecuente de exposición a PFOA es la ingestión, seguida de la inhalación y, en menor medida, la absorción cutánea (Kudo y Kawashima, 2003; Haug *et al.*, 2011). Una vez en el organismo, no se han observado indicios de que el compuesto sea metabolizado, siendo sus principales destinos la sangre, el hígado, los riñones y los pulmones (Olsen *et al.*, 2003; Maestri *et al.*, 2006; Kärman *et al.*, 2010; Fromme *et al.*, 2010), y la orina su principal vía de excreción (Harada *et al.*, 2005). Cabe señalar que la vida media del compuesto en nuestro organismo es de 2 a 4 años (Kudo y Kawashima, 2003; Andersen *et al.*, 2006). También se ha observado que el

PFOA se transfiere al feto a través de la placenta (Gützow *et al.*, 2012), que los lactantes se exponen a concentraciones del compuesto mayores que los adultos (Kärman *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2008; Fromme *et al.*, 2009) y que la cantidad de sustancia acumulada aumenta con la edad (Haug *et al.*, 2011).

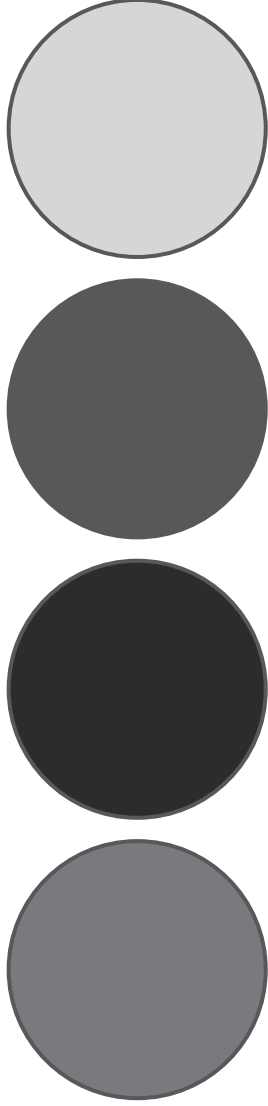


FIGURA 8. Ejemplos de materiales para cuya fabricación se emplea PFOA. De izquierda a derecha, menaje antiadherente de cocina, prendas impermeables y revestimientos plásticos de equipos informáticos.

La mayoría de los estudios toxicológicos se han centrado en analizar los efectos del PFOA en animales de experimentación (Kennedy *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2007). Si bien las extensas investigaciones no sugieren una asociación consistente entre la exposición al compuesto y problemas significativos para la salud humana (Butenhoff *et al.*, 2004; Steenland *et al.*, 2010), diversos estudios en roedores indican que puede inducir toxicidad durante la gestación y el periodo postnatal (Hinderliter *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2006), suprimir la función del sistema inmune (Yang *et al.*, 2002), provocar efectos neurotóxicos (Johansson *et al.*, 2008) y causar distintas clases de tumores (Post *et al.*, 2012).

En cuanto a los estudios *in vitro*, resultados obtenidos en células tumorales (Mulkiewicz *et al.*, 2007) y no tumorales (Fernández Freire *et al.*, 2008) sugieren que el PFOA no es muy tóxico a nivel celular. Sin embargo, existen datos acerca de la capacidad de este compuesto de alterar el ciclo celular, inducir apoptosis y ejercer efectos genotóxicos en la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 (Panaretakis *et al.*, 2001; Yao y Zhong, 2005), aunque su mecanismo de acción no está completamente caracterizado (Post *et al.*, 2012).

OBJETIVOS



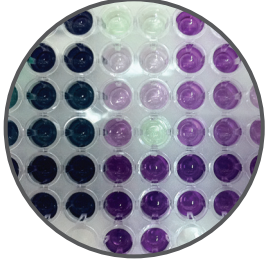
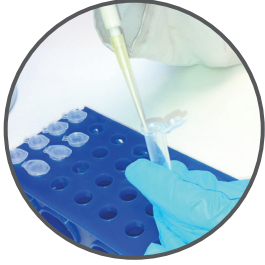
Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el presente estudio propone una estrategia integrada que pretende reproducir en el laboratorio condiciones experimentales que permitan obtener datos con un alto valor predictivo para la toxicidad en humanos. Para ello, planteamos un diseño metodológico que combina distintos tiempos de tratamiento con análisis multiparamétricos, empleando hasta cinco líneas celulares establecidas y tres contaminantes emergentes de interés.

El objetivo global de esta Tesis es caracterizar la idoneidad de distintas aproximaciones experimentales *in vitro* para obtener un conocimiento mecanicista de las respuestas celulares asociadas a la exposición a xenobióticos, que permitan realizar una valoración toxicológica completa encaminada a prevenir los riesgos asociados con la presencia ubicua de contaminantes ambientales.

Los objetivos concretos de este trabajo se detallan a continuación:

- Evaluar la citotoxicidad basal del di (2-etilhexil) ftalato en las líneas celulares HaCaT y Vero y determinar su mecanismo de acción tóxica.
- Determinar las respuestas celulares asociadas con la exposición prolongada a bajas dosis de triclosán en las líneas celulares HaCaT, MDA-MB-231 y MCF7.
- Evaluar la posible inducción de toxicidad retardada como consecuencia de la exposición a ácido perfluorooctanoico en las líneas celulares HeLa y HaCaT.

MATERIAL & MÉTODOS



1. COMPUESTOS QUÍMICOS

Para llevar a cabo la investigación de esta tesis doctoral se realizó en primera instancia una búsqueda de compuestos con interés toxicológico que además cumplieran con las siguientes características:

- se consideraran contaminantes emergentes y se encontraran indexados en listas prioritarias de organismos internacionales para la evaluación de sus efectos medioambientales y sobre la salud;
- se contara con evidencias científicas que demuestran sus efectos adversos en distintos modelos experimentales, aunque se desconociera hasta la fecha su mecanismo de acción tóxica; y
- se encontraran presentes de forma habitual en muestras biológicas y productos de uso cotidiano.

En base a esto, los compuestos seleccionados para el presente trabajo fueron el di (2-etilhexil) ftalato (DEHP; Fluka, EE.UU.), el triclosán (TCS; Sigma, EE.UU.) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA; Sigma). Las principales características físico-químicas de los mismos se detallan a continuación (Tabla 1):

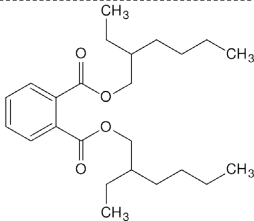
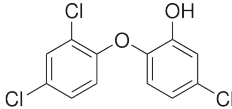

	DEHP	TCS	PFOA
Número CAS	117-81-7	3380-34-5	335-67-1
Molécula			
Fórmula molecular	$C_{24}H_{38}O_4$	$C_{12}H_7Cl_3O_2$	$C_8HF_{15}O_2$
Peso Molecular	390.56 g mol ⁻¹	289.54 g mol ⁻¹	414.09 g mol ⁻¹
Punto de fusión	-55 °C	54 – 57.3 °C	54.3 °C
Punto de ebullición	384 °C	280 – 290 °C	192.4 °C
Solubilidad en agua	0.041 mg l ⁻¹	10 mg l ⁻¹	9.5·10 ³ mg l ⁻¹
Log Kow	7.6	4.76	6.3

TABLA 1. Principales características físico-químicas de los compuestos objeto de estudio.

Las soluciones iniciales de los tres compuestos (Tabla 2) se esterilizaron por filtración mediante el empleo de filtros de 0.22 μm (Millipore®, EE.UU.), salvo aquellas preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO), que se esterilizaron después de ser diluidas en medio de cultivo. La elaboración de las diluciones de uso se realizó en fresco a partir de las soluciones iniciales en medio de cultivo sin rojo fenol con suero al 2%, sin que la concentración del solvente superara en ningún caso el 0.5%.

Compuesto	Solvente	Solución inicial	Rango
DEHP	Etanol absoluto	10^{-1} M, 10^{-3} M	1-100 μM
TCS	Etanol absoluto	10^{-2} M, 10^{-3} M y 10^{-5} M	1-30 μM y 0.25-2 μM
PFOA	DMSO	10^{-1} M, 1 M	10-500 μM

TABLA 2. Solventes, soluciones iniciales y rango de concentraciones evaluado de los tres compuestos analizados en este trabajo.

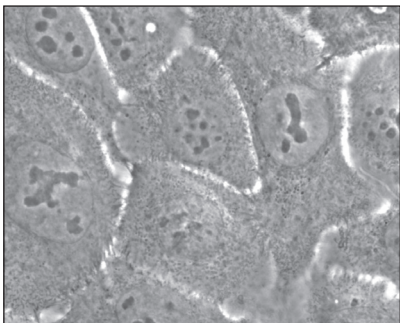


2. CULTIVOS CELULARES

2.1. LÍNEAS CELULARES

Para llevar a cabo el presente trabajo se seleccionaron cinco líneas celulares establecidas obtenidas de la colección americana de cultivos tipo (ATCC®, *American Type Culture Collection*) y del servicio de líneas celulares (CLS, *Cell Line Service*), de las cuales cuatro eran humanas (HaCaT, HeLa, MDA-MB-231, MCF7) y una de primate (Vero). Sus principales características se resumen a continuación:

- Las células HaCaT (Tabla 3) son una línea celular establecida procedente de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente a partir de su incubación a temperaturas altas y concentraciones bajas de Ca^{2+} en el medio de cultivo (Boukamp *et al.*, 1988). Esta línea celular conserva la gran mayoría de las características de queratinocitos humanos primarios, manteniendo una adecuada síntesis de queratinas, así como un fenotipo epidérmico prácticamente normal, incluso después de más de 300 subcultivos (Boukamp *et al.*, 1997; Fusenig y Boukamp, 1998). Las células HaCaT presentan una morfología poligonal, son atumorigénicas tras su inyección en ratones atímicos y poseen una notable estabilidad cromosómica (Boukamp *et al.*, 1997).

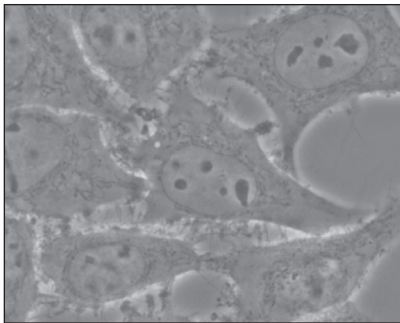


HaCaT

Código: CLS 300493
Organismo: *Homo sapiens* (♂)
Origen: Piel - no tumoral
Tipo celular: Queratinocito - adherente
Duración ciclo celular: ≈ 24h

TABLA 3. Características principales de la línea celular establecida HaCaT.

- Las células HeLa (Tabla 4) fueron las primeras células que superaron el límite de Hayflick y son, por tanto, el linaje celular establecido más antiguo (Gey *et al.*, 1952). Derivan de una muestra de cáncer cérvico-uterino obtenida en 1951 durante la realización de una biopsia (Scherer *et al.*, 1953). Del acrónimo del nombre de la paciente, Henrietta Lacks, procede el nombre de la línea celular. Las células HeLa son aneuploides, presentan un fenotipo epitelial, tienen incorporadas secuencias del papilomavirus humano 18 (HPV-18) y carecen de proteína p53 funcional (Scheffner *et al.*, 1991).



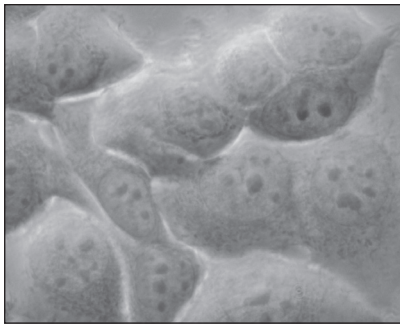
HeLa

Código: ATCC® CLL-2™
Organismo: *Homo sapiens* (♀)
Origen: Cervix - adenocarcinoma
Tipo celular: Epitelial - adherente
Duración ciclo celular: ≈ 20h

TABLA 4. Características principales de la línea celular establecida HeLa.



- Las células MCF7 (Tabla 5) fueron las primeras células de cáncer de mama en ser mantenidas en cultivo de forma permanente. MCF7 es el acrónimo de “*Michigan Cancer Foundation-7*”, instituto de investigación en el que se estableció la línea celular a partir del derrame pleural de un adenocarcinoma de mama metastático (Soule *et al.*, 1973). Desde entonces, es el tipo celular más utilizado para llevar a cabo estudios experimentales de cáncer de mama positivo para receptores de estrógenos (Levenson y Jordan, 1997). Estas células son salvajes para p53 y difícilmente sufren fragmentación del ADN por apoptosis, ya que carecen de actividad caspasa-3 (Essmann *et al.*, 2004). Exhiben algunas características de epitelio mamario diferenciado, como la síntesis de estradiol y la expresión de receptores de progesterona y estrógenos (Levenson y Jordan, 1997).



MCF7

Código: ATCC® HTB-22™

Organismo: *Homo sapiens* (♀)

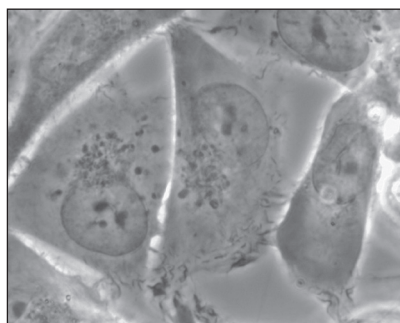
Origen: Glándula mamaria - adenocarcinoma

Tipo celular: Epitelial - adherente

Duración ciclo celular: ≈ 29h

TABLA 5. Características principales de la línea celular establecida MCF7.

- La línea celular MDA-MB-231 (Tabla 6) fue aislada por Cailleau y colaboradores en 1973, a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente de 51 años con un adenocarcinoma de mama grado III. Se trata de células adherentes que presentan un crecimiento extraordinariamente rápido, debido en parte a la regulación autocrina a partir de factores de crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio. Poseen abundantes receptores de membrana para el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*), aunque no se sobreestiman con dicho factor (Martínez-Carpio *et al.*, 1999). Estas células carecen de proteína p53 funcional (D’Assoro *et al.*, 2004) y no expresan receptores de progesterona ni de estrógenos, por lo que se utilizan como modelo *in vitro* del cáncer de mama hormono-independiente (Rochefort *et al.*, 2003).



MDA-MB-231

Código: ATCC® HTB-26™

Organismo: *Homo sapiens* (♀)

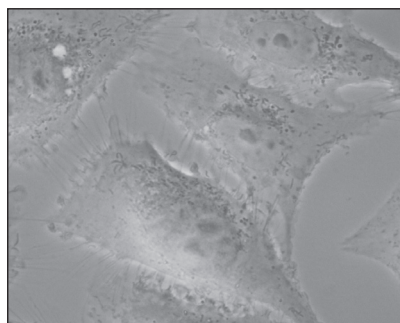
Origen: Glándula mamaria - adenocarcinoma

Tipo celular: Epitelial - adherente

Duración ciclo celular: ≈ 20h

TABLA 6. Características principales de la línea celular establecida MDA-MB-231.

- La línea celular establecida Vero (Tabla 7) es un tipo celular aneuploide procedente de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Fue aislada en 1962 por Yasumura y Kawakita en la universidad de Chiba, Japón (Yasumura y Kawakita, 1963) y, desde entonces, ha sido ampliamente utilizada para estudios de virología, aunque su origen renal las ha convertido también en un buen modelo para realizar estudios toxicológicos (Sonnenbichler *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2004; Fernández Freire *et al.*, 2009). De hecho, es uno de los tipos celulares recomendados por las normas ISO para pruebas de toxicidad (ISO, 2009). Las células Vero presentan determinadas características que las convierten en un modelo óptimo para la realización de estudios morfológicos, como su citoplasma amplio y plano y la elevada densidad de orgánulos citoplasmáticos (Grigoriev *et al.*, 1997).



Vero

Código: ATCC® CLL-81™

Organismo: *Cercopithecus aethiops* (♂)

Origen: Riñón - no tumoral

Tipo celular: Epitelial - adherente

Duración ciclo celular: ≈ 23h

TABLA 7. Características principales de la línea celular establecida Vero.

2.2. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Infraestructura y material de cultivos

Equipamiento

- Cabina de flujo laminar vertical FLVA150 (TDI, España), nivel de bioseguridad 2
- Incubador de CO₂ Heracell 150 (Heraeus, Alemania)
- Microscopio binocular invertido CH-BI45-2 Olympus (Japón). Objetivos 4X, 10X y 20X
- Baño termostatzado a 37 °C (Selecta Precistern, España)

Medio y suplementos (Lonza, Bélgica)

- Medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), con y sin rojo fenol
- Penicilina - Estreptomicina (10000 U/mL - 10000 µg/mL)
- Suero fetal bovino
- Tampón fosfato salino (PBS), pH = 7.2-7.4
- Tripsina 2.5% (p/v)
- Tripsina-EDTA (ácido etilendiaminoacético, 200 mg/L)

Procedimiento

Los cultivos se iniciaron a partir de viales de células conservadas a -80 °C en suero fetal bovino con DMSO al 10% (v/v). Tras una descongelación rápida en un baño a 37 °C, las células se sembraron en frascos de 75 cm² con medio de cultivo DMEM con 4.5 g/L de glucosa, 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina y 10% (v/v) de suero fetal bovino, manteniéndose en un incubador a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5%. En el caso de la línea celular MCF7, el medio de cultivo se suplementó con insulina 0.01 mg/mL. Para el mantenimiento rutinario de las células se efectuaron subcultivos de las mismas una o dos veces a la semana, dependiendo del tipo celular, realizando diluciones 1:3 - 1:5 del cultivo de partida. Las células se despegaron de la superficie de cultivo empleando tripsina/tripsina-EDTA 0.25% (v/v) y se resuspendieron en medio de cultivo fresco para realizar una nueva siembra. En todos los casos, las células empleadas en los experimentos se encontraban entre el tercer y el decimo pase tras su descongelación.

Para llevar a cabo los distintos tratamientos con los compuestos se realizaron siembras exactas en distintas superficies de cultivo, en función de la aproximación experimental y del tipo celular utilizado (Tabla 8), determinando los volúmenes de suspensión necesarios mediante el recuento del número de células viables por mililitro en una cámara de Bürker (Exacta, Alemania).

Células/mL	4h	24h	72h	120h
HaCaT	$10 \cdot 10^4$	$10 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$
HeLa	-	$8 \cdot 10^4$	$4.5 \cdot 10^4$	-
MDA	-	$10 \cdot 10^4$	-	$2 \cdot 10^4$
MCF7	-	$20 \cdot 10^4$	-	$4 \cdot 10^4$
Vero	$8 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^4$	-	-

TABLA 8. Número de células por mililitro sembradas según el tipo celular y el tiempo de exposición al compuesto.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental, el modelo biológico y los parámetros a evaluar son tres factores implicados en la calidad y la especificidad de los datos que se obtienen en los estudios que emplean modelos *in vitro* (Gómez-Lechon y Castell, 1995). En el presente trabajo se ha planteado una aproximación metodológica en la que se han evaluado distintas condiciones de exposición al compuesto objeto de estudio, mediante el empleo de una batería de ensayos encaminados a valorar las principales dianas de toxicidad de células de mamífero en cultivo.



3.1. TOXICIDAD AGUDA

Para realizar los estudios de citotoxicidad aguda (Fig. 9), las células crecidas en frascos de 75 cm² se sembraron en placas multipocillo de poliestireno (con o sin cubreobjetos, en función del parámetro a evaluar) en medio de cultivo con suero al 10% (v/v) y se dejaron crecer durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, y cuando se encontraban dentro del periodo de crecimiento exponencial, las células se expusieron a las distintas concentraciones del compuesto objeto de estudio. Las diluciones de uso se prepararon inmediatamente antes de su uso desde una solución inicial en etanol o DMSO en medio de cultivo con suero al 2%. En esta aproximación experimental, las células permanecieron en contacto con el compuesto durante 24 horas. Transcurrido este periodo, se procesaron de acuerdo con los requerimientos del parámetro objeto de estudio. En el caso de los estudios de expresión de proteínas por western blot, se incluyeron además tiempos de exposición de 4 horas.

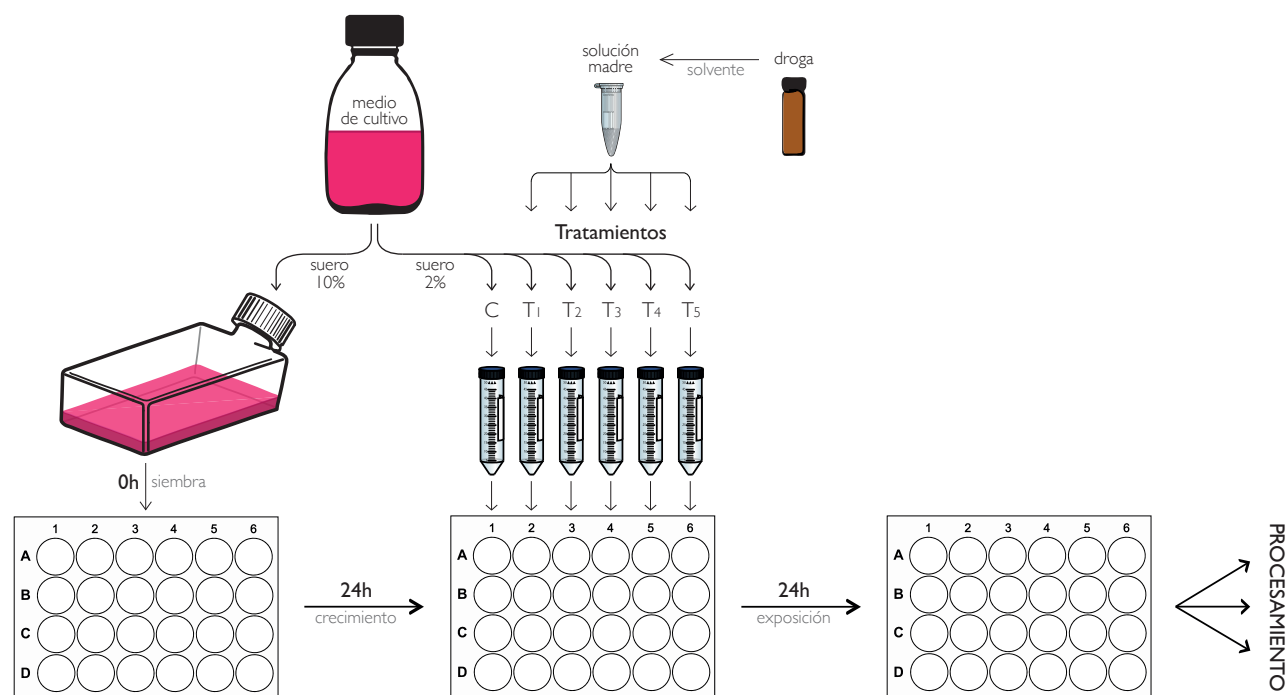


FIGURA 9. Diseño experimental de los estudios de toxicidad aguda. En esta aproximación metodológica, las células permanecieron expuestas al compuesto de estudio durante 24h. Transcurrido este tiempo, las células se procesaron de acuerdo con los distintos procedimientos experimentales.

3.2. TOXICIDAD POR EXPOSICIÓN PROLONGADA

Para realizar los estudios de citotoxicidad por exposición prolongada (Fig. 10), las células crecidas en frascos de 75 cm² se sembraron en placas multipocillo en medio de cultivo con suero al 10% y se dejaron crecer durante 24 horas. Transcurrido este periodo y al igual que en el caso anterior, las células se expusieron al compuesto en medio de cultivo con suero al 2% cuando se encontraban dentro del periodo de crecimiento exponencial. Tras 72 horas, se reemplazó el contenido de los pocillos por medio de cultivo nuevo con la dosis correspondiente del compuesto encada caso. En estas condiciones las células permanecieron en cultivo durante 48 horas más, hasta alcanzar un total de 120 horas en contacto en la droga. Finalizado el tratamiento, las células se procesaron de acuerdo con los distintos procedimientos experimentales.

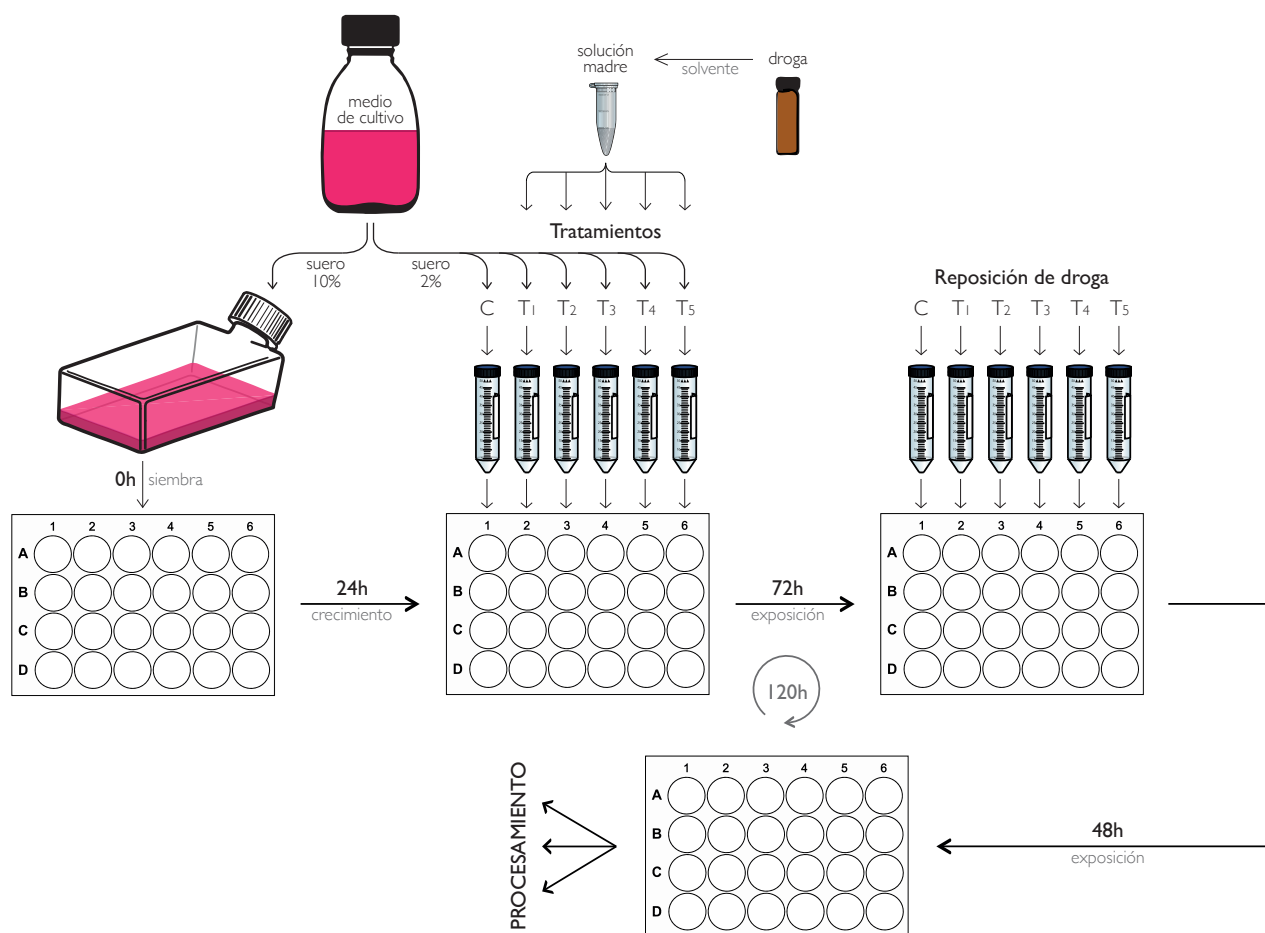


FIGURA 10. Diseño experimental de los estudios de toxicidad por exposición prolongada. En esta aproximación metodológica, las células permanecieron expuestas al compuesto de estudio durante 120h, reponiendo la droga tras las primeras 72h. Finalizado el tratamiento, las células se procesaron de acuerdo con los distintos procedimientos experimentales.

3.3. TOXICIDAD RETARDADA

Los estudios de toxicidad retardada (Fig. 11) se iniciaron con la siembra de las células en placas multipocillo, permaneciendo durante 24 horas en medio de cultivo con suero al 10%. Transcurrido este periodo, y cuando las células se encontraban en la fase de crecimiento exponencial, se realizó la exposición al tóxico durante 24 horas. A continuación, se retiró en medio con droga y se reemplazó por medio de cultivo fresco con suero al 10%. Las células permanecieron en estas condiciones durante 48 horas más y posteriormente se procesaron

de acuerdo a los procedimientos para los que estaban destinadas. Parte de los estudios de toxicidad retardada se realizaron utilizando tiempos de recuperación de 8 días. En estos casos, las células se sembraron inicialmente en frascos de 75 cm². Transcurridas 24 horas, se expusieron al tóxico durante 24 horas y, posteriormente y en los mismos frascos, se les reemplazó la droga por medio de cultivo durante 48 horas. En este punto del tratamiento se sembraron en placas multipocillo en medio de cultivo con suero al 10%, permaneciendo en esta nueva superficie de cultivo 6 días más. El medio de cultivo se refrescó a los tres días con el objetivo de mantener los cultivos en buenas condiciones de pH y nutrientes. Finalizado el tratamiento, las células se procesaron de acuerdo con los distintos procedimientos experimentales.

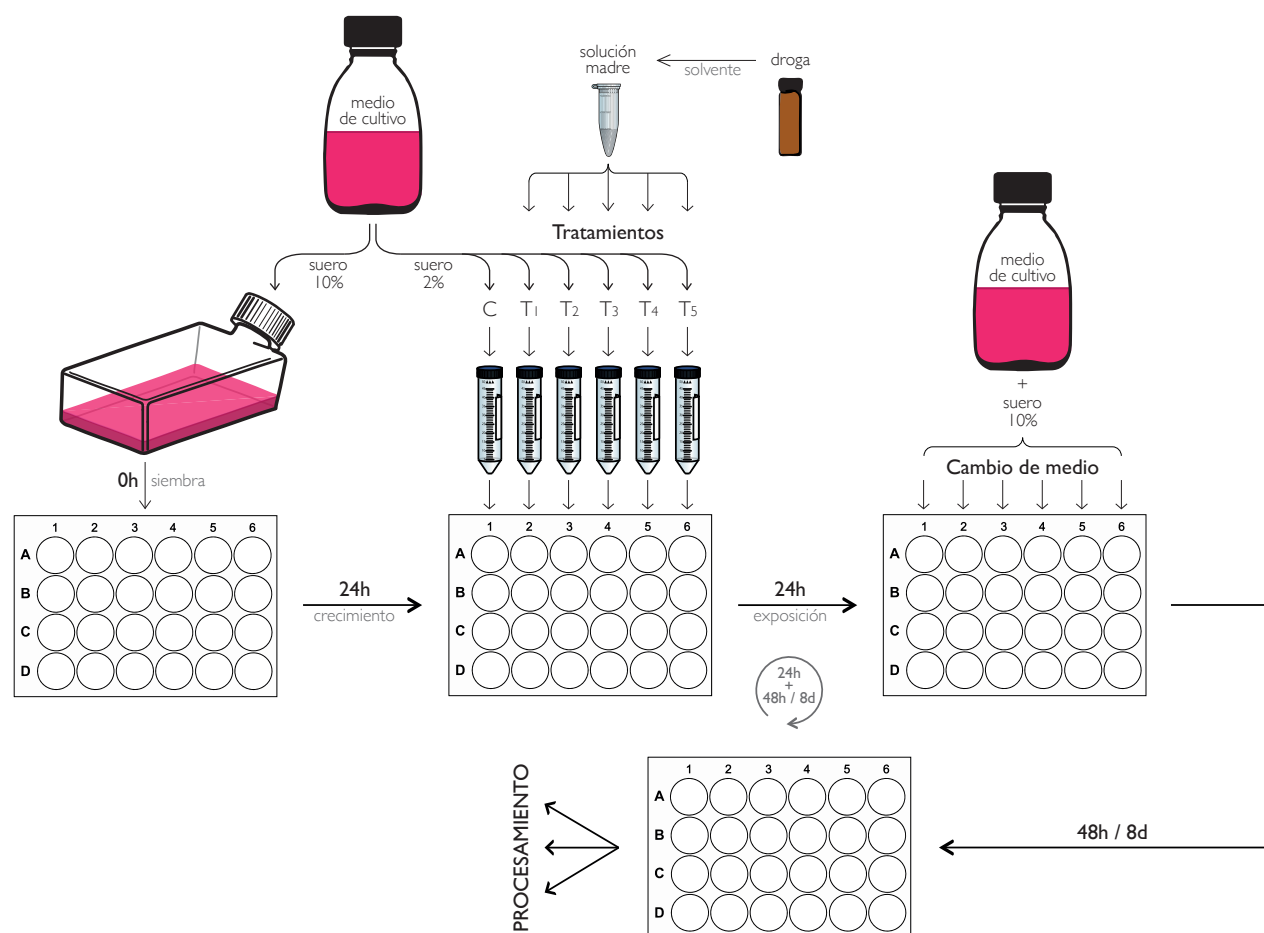


FIGURA 11. Diseño experimental de los estudios de toxicidad retardada. Tras 24h de exposición al compuesto, las células permanecieron 48h / 8 días en medio de cultivo libre de droga. Transcurrido este tiempo, las células se procesaron de acuerdo con los distintos procedimientos experimentales.

4. METODOLOGÍA

4.1. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR

4.1.1. Reducción del MTT

Fundamento

Cuando la sal de tetrazolio MTT (3-[4,5-dimetiltiazolil-(2)]-2,5-difenil-2H-bromuro de tetrazolio) se añade al medio de cultivo, las células viables la incorporan en su interior. Una vez en el citoplasma atraviesa la doble membrana mitocondrial, donde la enzima succinato deshidrogenasa reduce el MTT soluble a formazán insoluble de color azul. Las células muertas y aquellas que presentan daños en su membrana plasmática o una disfunción mitocondrial como consecuencia de la acción citotóxica de un xenobiótico no pueden reducir el MTT y, por lo tanto, no producen formazán. Una vez retirado el medio de cultivo, se solubiliza convenientemente el producto final y se procede a la lectura del color desarrollado que, en comparación con el cuantificado en los cultivos control, es un indicador directo del número de células que permanecen funcionales. El ensayo del MTT se realizó según el protocolo descrito por Mosmann (1983), pero utilizando DMSO puro como disolvente del formazán, de acuerdo al procedimiento descrito por Denizot y Lang (1986).

Reactivos

- MTT (Sigma-Aldrich)
- Medio completo sin suero
- PBS
- DMSO (Panreac)

Procedimiento

Se preparó una solución stock de MTT 5 mg/mL en PBS. Una vez disuelta, se esterilizó por filtración mediante un filtro Millipore® 0.22 µm y se conservó en un frasco de vidrio opaco a 4 °C. Inmediatamente antes de comenzar el ensayo, esta solución stock se diluyó en medio completo sin suero en proporción 1:11 y se atemperó en un baño termostatzado a 37 °C. En condiciones de esterilidad y una vez finalizado el tratamiento, se vació por aspiración el medio de cultivo de los pocillos y se realizó un lavado con PBS a 37 °C. A continuación, se añadió a cada pocillo 1 mL de medio de cultivo con el MTT ya incorporado y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C y con atmósfera de CO₂ del 5%. Finalizado este periodo, se retiró el medio por aspiración y se añadió a cada pocillo 1 mL de DMSO. Para garantizar la disolución del formazán, las muestras se sonicaron durante 5 segundos en un baño de ultrasonidos

Branson 2200 (Emerson, EE.UU). Tras 10 minutos de incubación a TA, se procedió a leer el color desarrollado a 570 nm mediante un lector de placas SPECTRAFluor. El cálculo del porcentaje de viabilidad con respecto al control se realizó asignando el valor 100 a la media de absorbancia de los controles.

4.1.2. Captura de rojo neutro

Fundamento

El ensayo del rojo neutro consiste en la incorporación de dicho colorante vital por parte del compartimento endosomal de células con membranas no dañadas. Para ello es necesario que tanto la membrana plasmática como el compartimento endosomal se encuentren completamente funcionales. El rojo neutro presenta gran afinidad por compartimentos ácidos, teniendo una elevada preferencia por el endosomal. El mecanismo por el cual el colorante queda recluido en el ambiente ácido de lisosomas y endosomas es la protonación de la molécula en su interior. El compuesto con una carga positiva no puede atravesar las membranas, almacenándose en el interior de las vesículas del compartimento endosomal. La cuantificación del colorante vital incorporado por las células se realiza por medidas de absorción a 540 nm del colorante extraído mediante una mezcla de ácido acético y etanol, existiendo una relación lineal entre la absorción y el número de células vivas (Borenfreund y Puerner, 1985).

Reactivos

- Rojo neutro (Merck)
- PBS
- Medio de cultivo sin suero
- Cloruro de calcio (Merck)
- Formaldehído (Panreac)
- Etanol absoluto (Panreac)
- Ácido acético glacial (Merck)
- Agua destilada

Procedimiento

La solución madre de rojo neutro (4 mg/mL) en agua bidestilada esterilizada por filtración mediante un filtro Millipore® 0.22 µm se conservó en un frasco de vidrio opaco a 4 °C. Con ella se preparó una solución en medio de cultivo sin suero (50 µg/mL), que se dejó toda la noche en estufa a 37 °C y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm inmediatamente antes de su uso para retirar los precipitados cristalinos.

Una vez finalizado el tratamiento deseado y en condiciones de esterilidad, se lavaron los pocillos con PBS a 37 °C. Seguidamente, se añadió a cada pocillo 1 mL de medio de cultivo con el rojo neutro ya incorporado y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C y atmós-

fera de CO₂ del 5%. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio por aspiración y se lavaron los pocillos con un tampón que contenía formaldehído al 1% (v/v) y CaCl₂ al 1% (p/v) en agua destilada. Se retiró el tampón por aspiración y se añadió el tampón de extracción del colorante (1% de ácido acético glacial (v/v) y 50% de etanol absoluto (v/v) en agua destilada). Para facilitar la extracción del colorante incorporado las muestras se sonicaron durante 5 segundos en un baño de ultrasonidos. Transcurridos 10 minutos de incubación a TA, se procedió a leer el color desarrollado a $\lambda = 542$ nm. El cálculo del porcentaje de viabilidad con respecto al control se realizó dando el valor 100 a la media de absorbancia de los controles.

4.2. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN

4.2.1. Ensayo de Bradford

Fundamento

Cuando la acción tóxica de un xenobiótico ocasiona la muerte de las células de un cultivo, las interacciones con la biomatriz dejan de ser estables y la unión con el soporte del cultivo se rompe. Así pues, las células muertas que se desprenden y permanecen flotando son eliminadas fácilmente cuando se retira el medio de cultivo y se lava la monocapa. En estas circunstancias, la determinación de la proteína celular que permanece retenida en los pocillos en comparación con la de los cultivos control es un indicador directo del porcentaje de células vivas. La técnica empleada se basa en el método de Bradford (1976), con ligeras modificaciones para adaptarlo a las condiciones limitantes de volumen de las placas de 24 pocillos en las que fue realizado el ensayo. Este método se basa en la tinción inespecífica de proteínas con azul de Coomassie (G-250). La cuantificación se consigue por lectura colorimétrica a 595 nm e interpolación con los puntos de una recta patrón de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (p/v).

Reactivos

- PBS
- Agua destilada
- BSA (Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Bradford (BioRad, Alemania)

Procedimiento

En primer lugar, se construyó una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA (0-25 μ g/mL), donde la absorbancia del colorante mostraba linealidad partiendo de una solución madre de BSA (100 μ g/mL) en agua destilada. Una vez finalizado el tratamiento, se lavaron los pocillos con PBS y se lisaron las células en 0.5 mL de PBS, mediante el empleo de un rascador.

Las muestras se congelaron y descongelaron al menos dos veces antes de proceder a la cuantificación de la proteína. Para realizar la cuantificación se preparó una mezcla con 680 μL de agua destilada, 120 μL de lisado celular y 200 μL del reactivo de Bradford concentrado. La lectura se realizó en un lector de placas SPECTRAFluor a una $\lambda = 595 \text{ nm}$. Los valores de densidad óptica de cada pocillo se interpolaron sobre la recta patrón y se calculó la cantidad de proteína real multiplicando por el factor de dilución. El contenido de proteína celular total (CPT) se representó como porcentaje respecto al control, asignando el valor 100 a la media de los controles.

4.2.2. Recuento de índice mitótico

Fundamento

La interacción de sustancias tóxicas con las células de un cultivo puede ocasionar alteraciones en el normal desarrollo del ciclo celular. Estos efectos se traducen en variaciones de las tasas de división, bien incrementando o bien inhibiendo la proliferación celular. La determinación del índice mitótico (IM) permite realizar un estudio detallado del porcentaje de células del cultivo que se encuentran en división. La clasificación de las células en cada una de las fases de la mitosis se realiza siguiendo los criterios morfológicos clásicos, mediante tinción específica de la cromatina.

Reactivos

- Metanol absoluto (Panreac, España)
- Hoechst 33258 (Riedel-de Haën®, Alemania)
- Agua destilada
- PBS
- DePex® (Serva)

Procedimiento

Para llevar a cabo los recuentos de IM se emplearon tanto células crecidas en cubreobjetos y teñidas con Hoechst 33258 (2'-4-(Hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bis-1H-benzimidazol), un fluorocromo que se intercala específicamente en el canal menor del ADN, como células marcadas con anti α -tubulina y contrateñidas Hoechst 33258 (ver punto 4.3.2.). Las células se fijaron en metanol absoluto a -20°C durante 7 minutos. A continuación, se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente (TA) con una solución de Hoechst 33258 5 $\mu\text{g/mL}$ en agua destilada. Transcurrido este periodo, se lavaron con PBS, se dejaron secar y finalmente se montaron sobre portaobjetos con DePex®.

El recuento del número de células en cada una de las fases de la mitosis permitió obtener tanto los valores del IM como del índice de fases (IF). El IM representa la tasa de división del

cultivo y es el porcentaje de células que se encuentran en mitosis respecto del total de células contadas, mientras que el índice de fases expresa el porcentaje de células que se encuentran en cada fase de la mitosis, respecto del total de células que están en división. Para la determinación de estos índices se realizaron al menos tres recuentos de 1000 células (1500 en el caso de las células HaCaT) cada uno sobre muestras de tres experimentos independientes.

$$IM = (n^{\circ} \text{ células en división} / n^{\circ} \text{ células totales}) \cdot 100$$

$$IF = (n^{\circ} \text{ células en cada fase} / n^{\circ} \text{ células en división}) \cdot 100$$

4.2.3. Recuento del número de células

Fundamento

El recuento directo de células en un hemocitómetro es una forma sencilla de determinar el número real de células que hay en los cultivos. Su evaluación lo largo del tiempo permite realizar una estimación de la tasa de crecimiento celular lo que, combinado con otros parámetros relacionados con el ciclo celular, resulta de gran utilidad a la hora de determinar el efecto de un xenobiótico sobre las tasas de proliferación celular.

Reactivos

- Medio de cultivo
- Tripsina y tripsina-EDTA
- PBS
- Azul tripán al 0.4% (p/v) (Sigma-Aldrich)

Procedimiento

Se realizaron recuentos de células empleando un hemocitómetro, previo procesado del cultivo de acuerdo con el test de exclusión de azul tripán, que permite discriminar las células viables (que excluyen el colorante) de las no viables (marcadas en azul). Tras recogerse las células en medio de cultivo con suero, directamente de los frascos tratados y posteriormente tripsinizados, se preparó una alícuota de la suspensión celular y se mezcló con azul tripán al 0.4% (p/v) a partes iguales, realizándose recuentos del número de células viables y no viables por mililitro mediante una cámara de Bürker (Exacta, Alemania) en un microscopio Zeiss 20T con contraste de fase (Zeiss, Alemania). Se determinó el número real de células que hay en los cultivos de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$n^{\circ} \text{ células} = n^{\circ} \text{ obtenido en recuento} \cdot 2 \cdot \text{volumen muestra (mL)} \cdot 10^4$$

4.2.4. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Fundamento

El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo se basa en la capacidad del colorante ioduro de propidio de emitir fluorescencia tras unirse al ADN de manera estequiométrica. Teniendo en cuenta que la carga de ADN de una célula varía a lo largo del ciclo celular, la cuantificación de la fluorescencia del ioduro de propidio permite realizar un seguimiento del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

Reactivos

- Tripsina y tripsina-EDTA
- RNAsa A de páncreas bovino (Sigma-Aldrich)
- PBS
- Citrato de sodio tribásico dihidratado (Merck, Alemania)
- Etanol 70% (v/v) (Panreac)
- Ioduro de propidio (Sigma-Aldrich)

Procedimiento

Una vez finalizado el tratamiento, se recogieron tanto las células del sobrenadante como las que permanecían ancladas al sustrato, estas últimas mediante tripsinización. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 1500 rpm. A continuación, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 1 mL de PBS y se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 1500 rpm. Se retiró el sobrenadante y se fijó el pellet con 1 mL de etanol 70% a -20 °C. Las muestras fijadas se almacenaron a 4 °C durante al menos 18 horas. Transcurrido este periodo, se resuspendió el sedimento y se centrifugó 10 minutos a 1500 rpm. Se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de tampón de ciclo (RNAsa A 50 µg/mL, ioduro de propidio 50 µg/mL en citrato sódico tribásico dihidratado al 0.1% (p/v) en agua bidestilada). Tras 30 minutos de incubación en oscuridad, se cuantificó la carga de ADN de las células mediante citometría de flujo. Para el análisis de muestras se utilizó un sistema de citometría Coulter EPICS® XL-MCL™ (Beckman Coulter Inc., EE.UU.), equipado con un láser de Argón 488. Se cuantificó la carga de ADN de al menos 15000 células por experimento y se realizaron al menos tres réplicas de cada uno. Los datos se procesaron mediante las aplicaciones Expo32 ADC (Beckman Coulter Inc.) y ModFit LT™ 3.0 (Verity Software House Inc., EE.UU.).

4.3. MORFOLOGÍA CELULAR

Los estudios de microscopía fueron realizados mediante el empleo de un microscopio óptico Leica DMI300B (Leica Microsystems, Alemania) equipado con:

- Objetivos secos: 10X (fase 1, AN 0.3) y 40X (fase 2, AN 0.75)
- Objetivos de inmersión: 63X (fase 3, AN 1.4) y 100X (fase 3, AN 1.4)
- Fuente de luz compacta EL6000
- Filtros de excitación: ultravioleta ($\lambda = 360-370$ nm), azul ($\lambda = 470-490$ nm) y verde ($\lambda = 540-80$ nm)
- Filtros de emisión: azul ($\lambda = 420$ nm), verde ($\lambda = 515$ nm) y rojo ($\lambda = 610$ nm)

Las imágenes digitales fueron capturadas con una cámara CCD Leica DFC310FX acoplada al microscopio. El procesamiento de las mismas se realizó con el software Leica Application Suite 3.5.0 (Leica Microsystems) y el programa Adobe® Photoshop® CS6 (Adobe Systems Incorporated, EE.UU.).

4.3.1. Análisis morfológico *in vivo*

La observación microscópica de células vivas puede llevarse a cabo durante un breve periodo de tiempo aunque no se disponga de un sistema de control de temperatura y CO₂, lo que permite realizar estudios morfológicos evitando los procesos de fijación. El empleo de estas técnicas, junto con determinados compuestos fluorescentes que presentan características físico-químicas que posibilitan su localización específica en algún compartimento subcelular, permiten realizar estudios de daño subcelular y valorar efectos citotóxicos sobre dianas intracelulares específicas.

- Microscopía óptica de contraste de fase

Fundamento

El estudio de la morfología celular general en busca de posibles anomalías puede tomarse como un indicador del efecto tóxico ejercido por un xenobiótico, como paso previo al estudio del daño a nivel subcelular.

Reactivos

- PBS

Procedimiento

Una vez finalizados los distintos tratamientos, se retiró el medio de cultivo de las células y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente, se montaron los cubreobjetos directamente sobre PBS. La observación y captura de imágenes se realizó durante los 5 minutos siguientes al montaje.

- Marcaje supravital con naranja de acridina

Fundamento

La observación del patrón de distribución de los lisosomas se llevó a cabo *in vivo* mediante un protocolo de marcaje supravital con naranja de acridina (3,6-bis (dimetilamino) acridina). Este compuesto presenta determinadas características físico-químicas que permiten su acumulación en los lisosomas, debido al pH ácido de los mismos. La elevada concentración favorece la formación de oligómeros de naranja de acridina, que provocan un efecto meta-cromático, de modo que los lisosomas emiten luz en el rango del rojo-anaranjado, mientras que el resto de estructuras citoplasmáticas emiten luz verde cuando se excitan con luz azul (Milot *et al.*, 1997).

Reactivos

- Naranja de acridina (BDH Chemicals, Reino Unido)
- Medio de cultivo sin suero
- PBS

Procedimiento

Una vez finalizado el tratamiento deseado, las células crecidas sobre cubreobjetos se lavaron con PBS y se incubaron durante 8 minutos a 37 °C con una mezcla de naranja de acridina 10 μ M en medio de cultivo sin suero. Transcurrido este periodo, se realizaron dos lavados con PBS y se montaron los cubreobjetos directamente sobre PBS. La observación se realizó mediante microscopía óptica de epifluorescencia, empleando un filtro de excitación azul (λ = 470-490 nm).

- Marcaje supravital con rodamina 123

Fundamento

Para estudiar la distribución *in vivo* del retículo mitocondrial de las células en cultivo se empleó rodamina 123 (2-(6-amino-3-imino-3H-xanten-9-il) ácido benzoico metil éster). La presencia de una carga deslocalizada, junto con su elevada lipofilidad, permite que este colorante vital se acumule selectivamente en las mitocondrias, gracias al potencial de membrana existente en su membrana interna (Chen, 1989).

Reactivos

- Rodamina 123 (Sigma-Aldrich)
- Medio de cultivo sin suero
- PBS

Procedimiento

Una vez finalizados los tratamientos, las células crecidas en cubreobjetos se lavaron con PBS y se incubaron 8 minutos a 37 °C con 1 mL de la mezcla de rodamina 123 (6.5 µg/mL) y medio de cultivo sin suero. Después de dos lavados en PBS, las células se montaron directamente en PBS y se observaron en el microscopio óptico de epifluorescencia con un filtro de excitación azul ($\lambda = 470\text{-}490\text{ nm}$). La captura de imágenes se realizó durante los 5 minutos posteriores al montaje.

4.3.2. Detecciones fluorescentes específicas

- Inmunodetecciones: α -tubulina, caspasa 3 activa y de anexina A1

Fundamento

Las técnicas de inmunofluorescencia se basan en la gran especificidad y la alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer moléculas y unirse a ellas. Además, la conjugación de los mismos con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades muy pequeñas del antígeno objeto de en las células mediante microscopía óptica de epifluorescencia. En el presente estudio se han empleado técnicas de inmunofluorescencia indirecta, que implican el uso de un anticuerpo primario sin marcar que se une al antígeno diana y un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo que se une al anticuerpo primario.

Reactivos

- | | |
|---|---|
| • PBS | • Anticuerpos primarios (Tabla 9) |
| • BSA (Sigma-Aldrich) | • Anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor 488 (Tabla 9) |
| • Metanol absoluto o formaldehído (Panreac) | • Hoechst 33258 (Riedel-de Häen®) |
| • Triton® X 100 (Merck) | • ProLong antifade Gold reagent (Molecular Probes Inc.) |
| • Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich) | |

Anticuerpo	Casa comercial	Concentración	Desarrollado en
Anti- α -tubulina	Sigma-Aldrich, EE.UU.	1:100	ratón
Anti-caspasa 3 activa	AbCam, Reino Unido	1:200	conejo
Anti-anexina A1	BD Biosciences, EE.UU.	1:250	ratón
Anti-ratón AlexaFluor 488	Molecular Probes Inc, EE.UU.	1:500	cabra
Anti-conejo AlexaFluor 488	Molecular Probes Inc, EE.UU.	1:500	cabra

TABLA 9. Anticuerpos empleados en la inmunodetección fluorescente de proteínas.

Procedimiento

M Tras los distintos tratamientos, las células se fijaron en metanol absoluto a -20 °C durante 7 minutos en el caso de la inmunodetección de α -tubulina y en formaldehído al 10% (v/v) en PBS a 4 °C durante 10 minutos en el caso de las inmunodetecciones de caspasa 3 activa y anexina A1. Después de la fijación, las células se conservaron a 4 °C en PBS. Antes de iniciar la inmunodetección, las células se lavaron en PBS de 10 minutos y se permeabilizaron durante 10 minutos con Triton® X 100 al 0.5 % (v/v) en PBS. Se realizó un bloqueo con albúmina de suero bovino al 5% (v/v) en PBS durante otros 10 minutos y a continuación se incubó el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS/BSA al 1% (v/v) durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Transcurrido este periodo, se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno, se repitieron la permeabilización y el bloqueo y se incubó el anticuerpo secundario diluido en PBS/BSA al 1% (v/v) durante 45 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Las diluciones de uso de los anticuerpos empleados, junto con otros datos de interés, se resumen en la tabla 9. Finalizada la inmunodetección, se realizaron tres nuevos lavados y se contratiñeron los núcleos con Hoechst 33258 (5 μ g/mL). Los preparados se montaron en definitivo con ProLong® antifade gold reagent. La observación se realizó en un microscopio óptico de epifluorescencia con filtro de excitación azul (λ = 470-490 nm) para los antígenos y ultravioleta (λ = 360-370 nm) para los núcleos. El control positivo de caspasa 3 activa se obtuvo mediante la incubación de células en medio de cultivo sin suero durante 24 horas.

- Detección de actina

Fundamento

La potente toxina de *Amanita phalloides*, conocida como faloidina, presenta gran afinidad por los microfilamentos de actina, los estabiliza e impide su despolimerización. De este modo, actúa como ligando específico permitiendo la visualización microscópica de esta estructura subcelular cuando se conjuga con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC).

Reactivos

- PBS
- BSA (Sigma-Aldrich)
- Formaldehído (Panreac)
- Triton® X-100 (Merck)
- Faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich)
- Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich)
- Hoechst 33258 (Riedel-de Haën®)
- ProLong® antifade Gold reagent (Molecular Probes Inc., EE.UU.)

Procedimiento

Después de los diferentes tratamientos, las células fueron fijadas durante 10 minutos en formaldehído al 10% (v/v) en PBS. Se permeabilizaron con Triton® X 100 al 0.5% (v/v) en PBS durante 5 minutos. Seguidamente, la faloidina rodaminada diluida 1:500 en PBS/BSA al 1% (v/v) se incubó 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Transcurrido este periodo, se realizaron tres lavados con PBS, se realizó una contratinción de núcleo con Hoechst 33258 (5 µg/mL) y se montaron los preparados con ProLong® antifade Gold reagent. La observación de los mismos se llevó a cabo empleando microscopía óptica de epifluorescencia con filtro de excitación verde ($\lambda = 540\text{-}580\text{ nm}$) para los microfilamentos de actina y ultravioleta ($\lambda = 360\text{-}370\text{ nm}$) para los núcleos.

4.3.3. Pruebas específicas- Lípidos*Fundamento*

El rojo Nilo es un derivado de oxazina muy lipofílico que se emplea para teñir lípidos neutros intracelulares. En condiciones normales, el rojo Nilo no es fluorescente y proporciona un marcaje difuso de color rojizo. Sin embargo, en ambientes ricos en lípidos el colorante se acumula y pasa a emitir una intensa fluorescencia de color amarillo-oro, lo que permite la identificación de estas estructuras, cuya acumulación citoplasmática se ha relacionado con la inducción de procesos de estrés celular.

Reactivos

- PBS
- Formaldehído (Panreac) al 10% (v/v) en PBS
- Rojo Nilo (Sigma-Aldrich) 0.1 mg/mL en agua destilada

Procedimiento

Finalizado el tratamiento, las células se fijaron en formaldehído/PBS al 10% (v/v) durante 10 minutos. A continuación, se dejaron secar al aire y tiñeron con rojo Nilo 0.1 mg/mL durante 8 minutos. Después de un lavado rápido, se montaron los cubreobjetos directamente sobre agua destilada y se observaron mediante microscopía óptica de epifluorescencia bajo un filtro de excitación verde. La captura de las imágenes se realizó durante los 5 minutos siguientes al montaje.

- Glucógeno

Fundamento

La reacción del ácido peryódico - reactivo de schiff (PAS, *Periodic Acid Schiff's reaction*) se fundamenta en el color fucsia que adquiere el producto de reacción entre dos grupos aldehídos próximos y el ácido sulfofucsínico, tras la oxidación de los primeros con ácido peryódico. La reacción del PAS revela la presencia de todo tipo de carbohidratos, como polisacáridos, glucógeno, glucolípidos y glucoproteínas.

Reactivos

- PBS
- Formaldehído (Panreac) al 10% (v/v) en PBS
- Ácido peryódico (Merck) 0.5% (v/v) en agua destilada
- Reactivo de Schiff (Merck)
- Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich)
- DePeX® (Serva)

Procedimiento

Una vez finalizado el tratamiento, se fijaron las células en formaldehído/PBS al 10% (v/v) durante 10 minutos. A continuación, se hidrataron 5 minutos en agua destilada y se trataron con ácido peryódico 0.5% (v/v) durante 5 minutos. Después de lavar los preparados con agua corriente, se tiñeron con el reactivo de Schiff durante 15 minutos, se lavaron de nuevo y posteriormente se tiñeron 2 minutos con hematoxilina de Harris. Finalmente, y tras eliminar el colorante excedente con agua corriente, se dejaron secar y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos en DePeX®.

- Bromuro de etidio / Naranja de acridina

Fundamento

El método del bromuro de etidio/naranja de acridina (BE/NA) se utiliza para evaluar la integridad de membrana plasmática y la viabilidad celular (Bank, 1988). De forma general, las

células viables incorporan el colorante NA y excluyen el BE, quedando su citoplasma marcado en verde. Por el contrario, las células no viables permiten el paso del BE a través de su membrana, quedando éste finalmente intercalado en el ADN, de manera que el núcleo queda marcado en rojo. Así, el uso combinado de estos dos fluorocromos permite distinguir entre células viables y las no viables mediante el empleo de un microscopio de fluorescencia.

Reactivos

- PBS
- Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich)
- Triton® X-100 (Merck)
- Naranja de acridina (BDH Chemicals)

Procedimiento

Tras finalizar los tratamientos, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con una mezcla de BE 5 μ M / NA 5 μ M en PBS durante 20 segundos a TA. Después de dos lavados en PBS, las células se montaron directamente en PBS y se observaron en el microscopio óptico de epifluorescencia con un filtro de excitación azul ($\lambda = 470-490$ nm). La captura de imágenes se realizó durante los 5 minutos posteriores al montaje. El control positivo de permeabilización de membrana se obtuvo mediante la incubación de las células con Triton® X-100 al 5% (v/v) en PBS durante 10 minutos.

- β -Galactosidasa asociada a senescencia

Fundamento

La actividad de la hidrolasa lisosomal β -galactosidasa a pH 6 se encuentra sobreexpresada en las células senescentes, considerándose un marcador bioquímico de este estado. El ensayo de la β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal) se basa en la utilización del sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactosido), que es degradado por la enzima produciendo un precipitado de color azul que se observa mediante microscopía óptica de campo claro (Dimri *et al.*, 1995).

Reactivos

- PBS
- Kit comercial CS0030 para la tinción histoquímica de células senescentes (Sigma-Aldrich)
- Eukitt® (Fluka)

Procedimiento

Tras finalizar los tratamientos y en condiciones de esterilidad, las células se fijaron durante 6 minutos a TA con una dilución 1X del tampón de fijación del kit (formaldehído al 20% v/v, glutaraldehído al 2% v/v, Na_2HPO_4 70.4 mM, KH_2PO_4 14.7 mM, NaCl 1.37 M y KCl 26.8 mM) en agua destilada filtrada. Después de tres lavados en PBS, se incubaron las muestras con la mezcla de tinción del kit (1 mL de la solución de tinción, 125 μL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 400 mM, 125 μL de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 400 mM, 0.25 mL de la solución X-gal y 8.5 mL de agua ultra pura) durante toda la noche a 37 °C y en ausencia de CO_2 . Transcurrido este periodo, las células se montaron en definitivo con Eukitt® y se realizaron al menos tres recuentos de 200 células por muestra, expresando los resultados como porcentaje de células positivas con respecto al control.

4.3.4. Análisis de ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión

M

Fundamento

La microscopía electrónica aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con dicha muestra, parte de ellos son dispersados selectivamente en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, generando finalmente una imagen sobre una cámara CCD que permite miles de aumentos con una altísima resolución. La observación del interior celular a grandes aumentos permite analizar con precisión distintos orgánulos y estructuras celulares, como mitocondrias, compartimento endosomal, retículo endoplásmico, núcleo, membrana plasmática, etc.

Reactivos

- Paraformaldehído (Panreac)
- Ácido tánico 0.15% (v/v) (Panreac)
- Tampón fosfato (Sigma)
- Acetato de uranilo (Panreac)
- Tetróxido de osmio (Sigma)
- Etanol (Panreac)
- Ferrocianuro potásico (Panreac)
- Resina Epoxi TAAB 812 (TAAB laboratorios, Reino Unido)

Procedimiento

Tras finalizar los tratamientos, las células se fijaron con una mezcla de paraformaldehído al 4% (v/v) y glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7,4 durante 1 hora a TA. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4. Seguidamente se realizó la postfijación de las muestras con tetróxido de osmio 1% (v/v) en agua y ferrocianuro potásico 1% (v/v) durante 1 hora a 4 °C. Después de tres lavados de 5 minutos en agua bidestilada, se añadió ácido tánico 0.15% (v/v) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 durante 1 minuto, se realizó un lavado con el mismo tampón y otro en agua bidestilada y se realizó en contraste con acetato de uranilo 2% (v/v) en agua bidestilada durante 1 hora a TA y en oscuridad. Posteriormente se realizaron tres nuevos lavados con agua destilada y se deshidrataron las muestras en etanol mediante lavados secuenciales de 10 minutos en etanol 50%, 75% y 90% (v/v) a 4 °C. Se realizó un último lavado de 15 minutos en etanol 100%, también a 4 °C. Seguidamente se realizó la infiltración (Epon/etanol (1:2) durante 60 minutos a TA, Epon/etanol (1:1) durante 60 minutos a TA, Epon/etanol (2:1) durante 60 minutos a TA, Epon 100% toda la noche a 4 °C, Epon completo 2 horas). Por último, las muestras se encapsularon y se dejaron polimerizar 48 horas a 60 °C. Terminada la polimerización, se realizaron cortes ultrafinos de las muestras y observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL TEM-1010 (Jeol, Japón) operando con una aceleración de 80 kV. Las imágenes se capturaron con una cámara digital Bioscan 792 (Gatan Inc., EE.UU.).

M

4.4. ANÁLISIS DE DAÑO AL ADN

La exposición a agentes tóxicos puede provocar respuestas que dañan el ADN, por este motivo se procedió a analizar diferentes biomarcadores de genotoxicidad como los niveles de 8-OHdG o el porcentaje de células con roturas de doble cadena de ADN.

4.4.1. Inmunodetección de 8-OHdG

Fundamento

Las bases de ADN son especialmente susceptibles a la oxidación mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). El bajo potencial redox de las guaninas hace que estas bases sean particularmente vulnerables y puede transformarlas en diversos productos de guanina oxidada (Burrows y Muller, 1998). Por este motivo, la localización de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es un parámetro útil y rápido para la detección de daño oxidativo al ADN (Yarborough *et al.*, 1996).

Reactivos

- Acetona (Panreac)
- Ribonucleasa A (RNAsa A; Sigma-Aldrich)
- PBS
- Hidróxido de sodio (Panreac)
- Cloruro de sodio (Panreac)
- Etanol 40% (v/v) (Panreac)
- Triton® X-100 (Merck)
- Peróxido de hidrógeno 30% (Panreac)
- Agua destilada
- Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich)
- Anticuerpo desarrollado en ratón anti-8-OHdG (JalCA, Japón)
- Anticuerpo secundario biotinilado del kit Histostain® SP (Zymed Laboratories Inc., EE.UU.)
- Estreptavidina - peroxidasa del kit Histostain® SP (Zymed Laboratories Inc.)
- Diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich)
- Eukitt® (Fluka)

Procedimiento

Las células crecidas en cubreobjetos y expuestas a los diferentes tratamientos fueron fijadas durante 10 minutos en acetona a 4 °C en placas Petri de vidrio. Una vez retirado el fijador, las muestras se dejaron secar al aire. El ARN se degradó empleando RNAsa A 50 µg/mL en PBS durante 1 hora a 37 °C. Tras varios lavados, las muestras se incubaron a 4 °C con tampón desnaturalizante (NaOH 70 mM, NaCl 0.14 M y etanol 40% (v/v) en agua destilada) durante 5 minutos. A continuación, se permeabilizó el material durante 5 minutos a 4 °C con Triton® X-100/PBS 0.5% (v/v). Posteriormente, se inactivó la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) en agua destilada durante 15 minutos a 4 °C. Antes de iniciar la inmunodetección, se realizó un bloqueo con PBS/BSA al 5% (v/v) durante 10 minutos. La incubación con el anticuerpo primario anti-8-OHdG (5 µg/mL) se llevó a cabo durante 18 horas a 4 °C en cámara húmeda. Transcurrido este periodo, se realizaron dos lavados con PBS, se volvió a permeabilizar con la solución de PBS/Triton 0.5% (v/v) y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario panespecífico biotinilado durante 10 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Después de dos lavados con PBS, se detectó el anticuerpo secundario mediante incubación con estreptavidina-peroxidasa 10 minutos a TA y posterior revelado con DAB 5 mg/mL en PBS durante 3 minutos a TA y oscuridad. Finalmente, se lavaron los cubreobjetos, se dejaron secar y se montaron en Eukitt®.

La cuantificación de la señal 8-OHdG positiva se realizó empleando ImageJ 1.41 (NIH, EE.UU.), según el protocolo de Toyokuni y colaboradores (1997). Las imágenes de diferentes campos capturados al azar en las mismas condiciones de intensidad de luz, tiempo de exposición y sensibilidad de la cámara, se transformaron a imagen en escala de grises y se procesaron hasta obtener los resultados de intensidad y tamaño de cada núcleo. A partir de estos datos se calculó el índice 8-OHdG según la siguiente ecuación:

$$\text{índice 8OH-dG} = \sum[(X - \text{umbral}) \cdot \text{área } (\mu\text{m}^2)] / \text{n}^\circ \text{ total de células}$$

(donde X es la densidad de tinción en escala de grises)

El número de partículas por fotografía estaba alrededor de 25, siendo en todos los casos superior a 10. El número mínimo de fotografías analizadas por tratamiento fue de 10 procedentes de 3 experimentos independientes. Sobre los datos de índice 8-OHdG se calcularon los valores de media y desviación estándar y finalmente realizaron los pertinentes análisis estadísticos.

4.4.2. Inmunodetección de γ -H2AX

Fundamento

La fosforilación de la histona H2AX (γ -H2AX) indica la presencia de roturas de doble cadena en el ADN, que se pueden observar por inmunodetección. Actualmente este parámetro se considera un biomarcador de gran utilidad y relevancia en el campo de estudio del daño al ADN (Kuo y Yang, 1998).

Reactivos

- Formaldehído (Panreac)
- Triton® X-100 (Merck)
- BSA (Sigma-Aldrich)
- PBS
- Hoechst 33258 (Riedel-de Haën®)
- Anticuerpo primario anti γ -H2AX desarrollado en ratón (Upstate®-Millipore™, EE. UU)
- Anticuerpo secundario anti-ratón, desarrollado en cabra, conjugado con AlexaFluor 488 (Sigma-Aldrich)
- ProLong® antifade Gold reagent (Molecular Probes)

Procedimiento

Las células crecidas en cubreobjetos y tratadas con el compuesto objeto de estudio se fijaron con formaldehído en PBS al 10% (v/v) a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron en PBS y se permeabilizaron durante 5 minutos con Triton® X-100 al 5% (v/v) en PBS. Se bloqueó con PBS/BSA al 5% (v/v) durante 10 minutos y se realizó la incubación con anti- γ -H2AX (2.0 $\mu\text{g/mL}$) durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo, se realizó un lavado con PBS, se repitieron la permeabilización y el bloqueo, y se incubó el anticuerpo secundario (20 $\mu\text{g/mL}$) durante 45 minutos a 37 °C, también en cámara húmeda. Finalmente, se realizó una contratinción para núcleo con Hoechst 33258 según el protocolo habitual y se montó con ProLong® antifade Gold reagent. La observación y los recuentos de células se realizaron en un microscopio óptico de fluorescencia con filtro de excitación azul ($\lambda = 470\text{-}490 \text{ nm}$) para la histona y ultravioleta ($\lambda = 360\text{-}370 \text{ nm}$) para los núcleos. Se realizaron al

menos tres recuentos de 200 núcleos interfásicos elegidos al azar sobre muestras procedentes de tres experimentos independientes, considerándose positivas las células con 10 o más focos nucleares de γ -H2AX.

4.5. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Fundamento

La expresión génica, medida como transcripción de ARN mensajero, no siempre es un reflejo directo de la síntesis de proteínas. Teniendo en cuenta que éstas son las efectoras de las respuestas celulares, su cuantificación resulta necesaria para poder concluir que los cambios ocurridos en un gen están relacionados con la respuesta a un agente tóxico. El western blot es un método analítico que se emplea para la detección y cuantificación de proteínas. La técnica se basa en la separación de las mismas según su peso molecular mediante electroforesis en gel de acrilamida. Una vez separadas, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, superficie sobre la que es posible realizar inmunodetecciones específicas, así como cuantificaciones mediante análisis de imagen densitométrico.

Reactivos

- PBS
- BSA (Sigma-Aldrich)
- BCATM Protein Assay kit (Thermo Scientific, EE.UU.)
- Tampón de carga: azul de bromofenol 1% (v/v) (Panreac), β -mercaptoetanol 5% (v/v) (Merck), SDS 20% (Panreac), glicerol 19% (v/v) (Panreac), Tris 1M pH 6.8 10% (v/v), H₂O destilada
- Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich)
- Persulfato amónico (Sigma-Aldrich)
- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Merck)
- Docecilsulfato sódico 1% (p/v) (SDS; Merck)
- Isobutanol (Merck)
- Tampón de lisis (Tabla 10)
- Tris-HCl 1 M
- Tris Glicina 1X (p/v) (Sigma-Aldrich)
- Acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v) (BioRad Laboratories Inc.)
- Marcadores de peso molecular: Rainbow™ Molecular Weight Markers (Amersham-GE Healthcare) y Precision Plus protein™ Dual color Standart (BioRad Laboratories Inc.)
- Metanol absoluto (Panreac) 20% (v/v) en agua bidestilada
- Rojo Ponceau (Merck)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana, España)
- Kit de quimioluminiscencia Immun-Star HRP (BioRad Laboratories Inc.)
- Anticuerpos primarios y secundarios (Tabla 11)

Compuesto	Concentración	Casa comercial
Compuesto	Concentración	Casa Comercial
Antipaina	10 mg/L	Sigma-Aldrich
Aprotinina	40 mg/L	Sigma-Aldrich
Benzamidina	1 mM	Sigma-Aldrich
Cloruro potásico	120 mM	Panreac
Di-tio-tritol	1 mM	Sigma-Aldrich
EDTA	1 mM	Sigma-Aldrich
EGTA	2 mM	Sigma-Aldrich
Fluoruro de sodio	100 mM	Sigma-Aldrich
Inhibidor de proteasas	1 mM	Calbiochem, EE.UU.
Leupeptina	1 mg/L	Sigma-Aldrich
Molibdato sódico	20 mM	Sigma-Aldrich
Nonidet P40	0.5 % (v/v)	Boehringer Mannheim, Alemania
Ortovanadato sódico	2 mM	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	20 mM	Sigma-Aldrich
Tritón® X 100	0.1 % (v/v)	Sigma-Aldrich
β-glicerofosfato	20 mM	Sigma-Aldrich

TABLA 10. Composición del tapón de lisis empleado en la técnica de western blot.

Anticuerpo	Casa comercial	Concentración	Desarrollado en
Anti-GRP78	Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.	1:2000	cabra
Anti-GADD153	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	conejo
Anti-Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	conejo
Anti-γ-tubulina	Sigma-Aldrich	1:1000	ratón
Anti-ratón con peroxidasa	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	burro
Anti-conejo con peroxidasa	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	burro
Anti-cabra con peroxidasa	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	burro

TABLA 11. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas por western blot.

Procedimiento

a) Preparación de la muestra

Una vez tratadas, las muestras se recogieron por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos y se lavaron con PBS. Tras eliminar cuidadosamente los restos del sobrenadante, se resuspendieron en tampón de lisis (100 μ L por cada 10^7 células) y se incubaron durante 90 minutos a 4 °C. Finalizado el tiempo de lisis, se centrifugaron y se reservó el sobrenadante para la cuantificación de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (BCA, *bicinchoninic acid*). Esta técnica se llevó a cabo empleando un kit comercial (BCA™ Protein Assay kit), en el que se combina la reducción del Cu^{2+} de las proteínas a Cu^+ en un medio alcalino con la detección colorimétrica del Cu^+ , empleando como reactivo el BCA. La reacción de dos moléculas de BCA con una de Cu^+ produce una coloración morada que, medida a una longitud de onda de 542 nm, proporciona un valor de absorbancia directamente proporcional a la cantidad de proteína de la muestra. Para determinar esta cantidad de proteína, se preparó una recta patrón a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino, y sobre ella se interpolaron los valores de absorbancia de cada muestra. La lectura de los datos se realizó en un lector de placas SPECTRAFluor. A partir de estos datos, se calculó el volumen de muestra necesario para cargar 50 μ g de proteína en cada carril del gel. La preparación de las muestras se completó añadiendo tampón de carga e incubando la mezcla durante 5 minutos a 100 °C en un termoblock Stuart® SBH 130D (Stuart®, Reino Unido).

b) Electroforesis en gel de acrilamida

Se preparó un gel de acrilamida con dos subdivisiones: una porción superior concentradora (Tris-HCl 1M, pH 6.8 y 5% de acrilamida) y una inferior separadora (Tris-HCl 1M, pH 8.7 y 12% de acrilamida). La electroforesis se llevó a cabo siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970), en condiciones desnaturalizantes y reductoras, de forma que las proteínas se separen únicamente en función del tamaño, ya que pierden sus estructuras secundaria y terciaria. Así, la electroforesis se llevo a cabo en un tampón que contenía Tris-Glicina 1X y SDS 1% (p/v) en agua bidestilada durante 2 horas a 100 V y TA.

c) Electrotransferencia

Las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa Amersham™ Hybond™-ECL (GE Haelthcare, Reino Unido), en la que se producen interacciones no covalentes de naturaleza hidrofóbica. La electrotransferencia se basa en el empleo de una corriente eléctrica y un tampón de transferencia que hacen que las proteínas migren del polo negativo al polo positivo, quedando unidas a la membrana. La transferencia de las proteínas se realizó en una cubeta con tampón Tris-Glicina 1X y metanol absoluto 20% (v/v) en agua bidestilada,

durante 1 hora a 100 V en cámara fría. La presencia de bandas en la membrana se comprobó mediante tinción con rojo Ponceau.

d) Bloqueo

Dado que a la membrana pueden unirse proteínas de forma inespecífica, es necesario bloquear los lugares de unión que han quedado libres después de la transferencia. Para ello se empleó una solución de bloqueo (lactoalbúmina al 10% (v/v) en TBS-Tween 20) durante 1 hora a TA en agitación constante. Las proteínas de la solución de bloqueo se unirán a las regiones de la membrana que no estén ocupadas por las proteínas transferidas, de forma que aumentamos la especificidad del anticuerpo.

e) Detección, revelado y análisis

Para determinar la presencia de las proteínas de interés, se llevó a cabo una inmunodetección indirecta mediante el empleo secuencial de un anticuerpo primario y uno secundario. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente en suero de bloqueo al 1% (v/v) durante toda la noche a 4 °C y agitación moderada. Una vez retirado el anticuerpo y tras tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20, se incubó en anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y diluido en solución de bloqueo al 1% (v/v) durante 1 hora a TA. El revelado del marcaje se realizó con el luminol del kit Immun-Star HRP en cámara oscura y se visualizó con el equipo VersaDoc™ Model 4000 Imagin System (Bio-Rad Laboratories). El análisis densitométrico de las bandas de proteína se realizó empleando el programa de análisis de imagen Image Quant TL (Amersham Biosciences). Los datos de cantidad de proteína fueron normalizados respecto al control de carga (γ -tubulina), que se detectó en las mismas membranas tras lavarlas con glicina 1M a pH 3 durante 40 minutos a 50 °C. Por último, los datos fueron normalizados respecto a su tratamiento control, expresando en tanto por uno el número de veces que estaba cada proteína respecto a su control.

4.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAY DE ADN

El análisis de la expresión génica por microarrays es una herramienta de estudio muy potente que permite determinar los cambios en la síntesis de ARN mensajero (ARNm) de multitud de genes simultáneamente. Para ello es preciso realizar un protocolo experimental que se divide en tres grandes etapas.

i) Obtención de ARN total y mensajero

La expresión de genes se realiza mediante la transcripción de ADN para formar ARNm cuya característica distintiva es la presencia de una secuencia poli (dA) en su extremo terminal.

Aprovechando esta particularidad y mediante un método de separación en columnas empleando bolas con secuencias poli (dT) (secuencia complementaria a la secuencia poli (dA)), se pueden aislar del resto de los ARN celulares.

Reactivos (Sigma-Aldrich)

- Cloroformo
- Isopropanol
- Acetato de sodio
- Glucógeno
- Dietilpirocarbonato (DEPC)
- Reactivo de aislamiento TRI Reagent®
- Kit miniprep ARNm GENELUTE
- Etanol
- Agarosa

Procedimiento

Tras recoger las células expuestas al compuesto objeto de estudio, se retiró el medio por centrifugación (10 minutos, 1200 rpm) y se lavaron las células con PBS. Tras volver a centrifugar, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento obtenido con el reactivo de aislamiento TRI Reagent® (10⁷ células/mL). Tras una cuidadosa agitación, las muestras se mantuvieron a -80 °C. A continuación, se procedió a aislar el ARN total siguiendo el método del fenol-cloroformo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). La extracción del ARN total se inició añadiendo 200 µL de cloroformo por cada mililitro de TRI Reagent® y, tras agitar las muestras, se incubaron durante 15 minutos a TA. Posteriormente se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C, lo que originó tres fases: la inferior orgánica de color rosado que contenía proteínas, otra intermedia blanca, donde se hallaba el ADN y por último, la fase superior acuosa e incolora que contenía el ARN. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al que se añadieron 500 µL de isopropanol por cada mililitro de TRI Reagent®. Después de 10 minutos de incubación a TA, se realizó una centrifugación a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C, obteniéndose en el fondo del tubo un depósito de ARN. Se retiró el sobrenadante con cuidado y se lavó el sedimento con etanol frío al 75% (v/v), centrifugándose seguidamente a 13000 rpm durante 5 minutos a TA. El depósito resultante se dejó secar al aire y se resuspendió finalmente en agua con dietilpirocarbonato 0.1% (v/v) libre de DNAsas y RNAsas. El ARN total se cuantificó empleando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale aproximadamente a 40 µg/mL. Además, para determinar su pureza se calculó el cociente A_{260}/A_{280} , que debía estar próximo a 2 para considerar que el ARN estaba en buenas condiciones. Finalmente se cargó en un gel de agarosa al 1% para comprobar su integridad.

En este punto, se purificó el ARN mensajero de las muestras como se indica a continuación. En un eppendorf se incubaron durante 3 minutos a 70 °C 100 µg de ARN total en agua con

DEPC, la solución de unión del kit GENELUTE y las bolas con los oligonucleótidos poli(dT). Posteriormente, se dejaron reposar a TA durante 10 minutos y se centrifugaron brevemente. Se retiró el sobrenadante. El sedimento, en que se encontraban unidas las bolas poli(dT) y el ARNm, se resuspendió en la solución de lavado, se transfirió a una columna y se centrifugó durante 2 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante. Esta operación se realizó por duplicado. A continuación, se retiró la columna y se colocó en un tubo nuevo, en el que se añadieron 50 µL del tampón de extracción precalentado a 70 °C y se incubó durante 5 minutos a 70 °C. Se realizó una centrifugación de un minuto. El ARNm purificado se precipitó con etanol absoluto, acetato de sodio (3:1) y glucógeno durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 15000 g durante 15 minutos a 4 °C, se añadió etanol 75% (v/v) y se volvió a centrifugar durante 5 minutos más. Una vez retirado el sobrenadante, se dejó secar a TA. El ARNm se resuspendió en agua con DEPC precalentada y se incubó 5 minutos a 65 °C. Tras centrifugar durante un minuto, se cuantificó de nuevo empleando un NanoDrop ND-1000 y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

ii) Marcaje de ADN complementario e hibridación en el biochip

Para realizar la hibridación de las muestras con las secuencias de ADN impresas en el biochip, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc). Este proceso se llevó a cabo mediante retrotranscripción inversa del ARNm, durante la que se incorporaron nucleótidos fluorescentes (dUTPs) marcados con cianinas verdes (Cy3) y rojas (Cy5). En este momento, las hebras de ADNc que procedían del control estaban marcadas con Cy3 (verde) y las de los cultivos expuestos a tóxicos con Cy5 (rojo). Estas secuencias se hibridaron en el biochip y durante este proceso ambos tipos de hebras se anclaron a sus complementarias. Los genes que vieron reprimida su expresión tras el tratamiento mostraron en el biochip el color verde del control. Por el contrario, aquellos genes cuya expresión estaba aumentada en respuesta al xenobiótico mostraron predominantemente el color rojo con el que se marcó la muestra problema.

El biochip utilizado para el estudio es el CholestChip™ (Biotools B&M Labs. S.A., España), un microarray especialmente diseñado por el Dr. Javier Martínez-Botas (Laboratorio de Microarrays del Servicio Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal) para el estudio del metabolismo de lípidos, ciclo celular, farmacogenómica y ensayos con xenobióticos. Contiene 319 secuencias génicas humanas con tamaños entre 0.4 y 1.0 Kbases, que fueron seleccionadas a partir de la base de datos I.M.A.G.E Consortium y se obtuvieron de OpenBiosystems Inc. (Thermo Scientific). Su desarrollo se debe al interés por determinar las relaciones que existen entre la obesidad y los problemas de metabolismo y ciclo celular, además de describir los efectos que presentan diferentes fármacos reguladores lipídicos sobre la expresión génica.

El microarray se imprimió en cristales de aminosilano empleando un robot de impresión SpotArray™ 72 (Perkin Elmer Inc., EE.UU.) con un diseño de impresión que distribuye triplicados en dos coordenadas distintas del *array*, de manera que cada sonda se imprimió seis veces, permitiendo comprobar la reproducibilidad de la prueba. El ADN se fijó al soporte mediante una irradiación de luz ultravioleta 300 mJ (GS GEN LINKER™, BioRad, EE.UU.) y una incubación durante 2 horas a 80 °C.

Reactivos

Los reactivos RT SuperScript II, di-tio-tritol (DTT), tampón de replicación 5x y Cot-1 DNA® se obtuvieron de Invitrogen (EE.UU.). Los cebadores aleatorios (*random primers*), los oligo dT y el inhibidor de RNAsas que se utilizaron eran de Promega (Promega Co., EE.UU.). Cy3-dUTP, Cy5-dUTP, las columnas de purificación de ADN del kit Illustra CyScribe GFX y las sondas control Lucidea™ *spike mix* procedían de Amersham-GE Healthcare (Reino Unido). El tampón tris-HCl, EDTA, BSA, DEPC y las bolas poli (dA) provenían de Sigma-Aldrich. El hidróxido de sodio era de Panreac y los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) fueron comprados a Applied Biosystems (EE.UU.). Para la hibridación se empleó el tampón del kit de hibridación de Perkin Elmer (EE.UU.) y para los lavados finales Arrayit® Wash buffers (A, B y C) (Arrayit® Co., EE.UU.).

Procedimiento

Se empleó el protocolo de Aldamassi y colaboradores (2001), con las modificaciones del Laboratorio de Microarrays del servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal. En un tubo eppendorf, se mezclaron 1 µg de ARNm con oligonucleótidos dT (0.5 µg/µL), los cebadores aleatorios (0.5 µg/µL) y de las sondas control (*spikes mix*) en presencia de agua con DEPC 0.1% (v/v) durante 10 minutos a 70 °C en el termociclador Peltier Thermal Cycle, PTC-200 (MJ Research, EE.UU.). El programa finalizó manteniendo las muestras a 4 °C. A continuación, se añadieron el tampón de replicación 5X, DTT 10 mM y una disolución con todos los desoxinucleótidos en agua con DEPC. Asimismo, se incorporaron un inhibidor de RNAsas (30U), los dUTP marcados con Cy3 para el control y Cy5 para las muestras tratadas y, por último, la transcriptasa inversa SuperScript II (14 U). Se realizó una incubación a 42 °C durante 2 horas en el termociclador. Posteriormente, se procedió a la degradación del ARNm mediante el empleo de EDTA e hidróxido de sodio durante 30 minutos a 65 °C. Las muestras se dejaron enfriar a 4 °C, tras lo cual se añadió tampón tris-HCl 1 M (pH 7.5) para purificar el ADNc en columnas GFX combinando las muestras control (Cy3) con las muestras tratadas (Cy5). Tras la purificación, se añadió a las mezclas 0.4 µg poli (dA) y 0.08 µg de Cot-1 DNA® y se secaron en un liofilizador Speed Vacuum SPD12IP (Termo Electron Co., EE.UU.).

El biochip se bloqueó durante 15 minutos a temperatura ambiente con albúmina de suero bovino al 1% (p/v) en agua precalentada a 50 °C, se lavó con agua bidestilada hirviendo du-

rante 5 minutos y se fijó durante 2 minutos en etanol 96% (v/v). Finalmente, se secó el cristal con una bomba de aire. Las muestras liofilizadas se resuspendieron en 20 μ L de tampón de hibridación durante 3 minutos a 50 °C y, tras un pulso en la centrífuga, se cargó la muestra sobre el biochip y se montó con un cubreobjetos. El microarray se incubó en una cámara de hibridación durante toda la noche a 50 °C. Transcurrido este tiempo, se retiraron los cubreobjetos de los soportes y se mantuvo el biochip en la solución de lavado A (1X) durante 5 minutos en agitación. A continuación se procedió del mismo modo con las soluciones B y C. Para concluir, se lavó con agua bidestilada y se secó con una bomba de aire, tras lo cual se procedió a la lectura de la muestra.

iii) Cuantificación de la expresión génica y análisis de los patrones de expresión

Tanto la lectura como el análisis de los resultados de un microarray requieren de un equipamiento específico acoplado a potentes herramientas informáticas que permiten evaluar los cambios de expresión génica en el contexto del biochip. Tras procesar el microarray, se introdujo en un escáner de lectura ScanArray (Perkin Elmer). Los valores medios de intensidad de fluorescencia de cada canal (Cy3-verde y Cy5-rojo) y de cada sonda fueron calculados automáticamente por el programa *ScanArray Express 3.0* (Perkin Elmer). El análisis de los resultados se realizó *on line*, en el enlace <http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>, utilizando la aplicación *Herramientas de normalización*, donde los datos de intensidad se corrigieron por sustracción del fondo y se normalizaron por global LOWESS. Los datos normalizados se filtraron para eliminar las sondas control, así como los datos con intensidad por debajo de los límites de confianza y las réplicas inconsistentes. Tras estos procesos se calculó el ratio Cy5/Cy3 para cada gen. En todos los casos, se consideraron cambios de expresión génica significativos aquellos que mostraron ratios Cy5/Cy3 mayores de 1.68 (Log_2 0.75) o menores de 0.56 (Log_2 -0.75). La presentación de los resultados del microarray se realizó con el programa TIGR Multiexperiment Viewer 3.1 (TM4 Software Development Team, EE.UU.), que permite construir diferentes diagramas de colores por columnas que relacionan los genes analizados según criterios estadísticos basados en distancias euclídeas.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La recopilación de los datos procedentes de los distintos estudios y la elaboración de las gráficas se llevó a cabo con la ayuda del programa informático Microsoft® Excel® 2007 (versión 12.0) (Microsoft Corporation, EE.UU.)

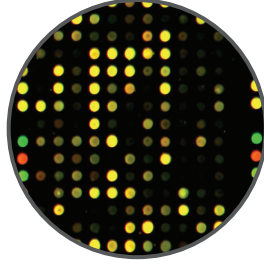
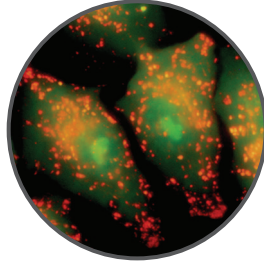
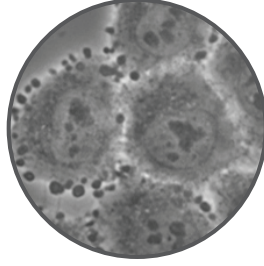
Los valores de EC50 de los estudios de citotoxicidad basal se calcularon con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, EE.UU.).

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos se llevaron a cabo con el software IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM, EE.UU.). Para llevar a cabo un análisis estadístico que permitiese detectar diferencias significativas entre las muestras tratadas y las muestras control se realizaron al menos tres experimentos independientes, variando el número total final en función del parámetro evaluado y del tipo de metodología empleada para su estudio.

Para cada parámetro estudiado se realizaron los test normalidad y homocedasticidad Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. En función de la información obtenida en estos test, los datos se analizaron de la siguiente forma:

- Si las muestras podían considerarse homogéneas y normales, los datos normalizados se analizaron mediante el test ANOVA, seguido de un test *post hoc* Bonferroni o Games Howell, en cada caso el más apropiado. Las diferencias se consideraron significativas a un valor $p \leq 0.05$.
- Si las muestras no eran homogéneas o no presentaban una distribución normal, se empleó el test de Kruskal-Wallis, analizándose las diferencias entre los pares mediante el test U de Mann-Whitney. En este caso las probabilidades fueron ajustadas mediante la corrección Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a un valor $p \leq 0.05$.

RESULTADOS



1. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD AGUDA: EL DI (2-ETILHEXIL) FTALATO

1.1. EFECTOS DEL DEHP SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA VIABILIDAD CELULAR

Los estudios de citotoxicidad basal del DEHP en las líneas celulares Vero y HaCaT se llevaron a cabo mediante una batería de ensayos *in vitro* complementarios entre sí, exponiendo las células durante 24 horas a concentraciones crecientes del compuesto en el rango de 1-100 μM . Los resultados, tanto de viabilidad (RN y MTT) como de crecimiento (CPT), mostraron un claro efecto dependiente de concentración, muy similar en ambas líneas celulares (Fig. 12). El test de incorporación de RN, relacionado con la integridad de las membranas, fue el primero en presentar diferencias significativas con respecto al control tanto en las células Vero (10 μM) como en las HaCaT (5 μM), y el único parámetro de citotoxicidad basal para el que se pudieron calcular valores de EC_{50} (13.3 y 12.1 μM respectivamente). El ensayo de reducción del MTT, que analiza principalmente el metabolismo oxidativo, así como la cuantificación de la proteína celular total (CPT) mediante el método de BRD, que se relaciona con el número de células presentes en el cultivo, sufrieron una caída moderada dosis-dependiente en ambas líneas celulares, alcanzando en la concentración de 100 μM valores cercanos al 60% respecto al control.

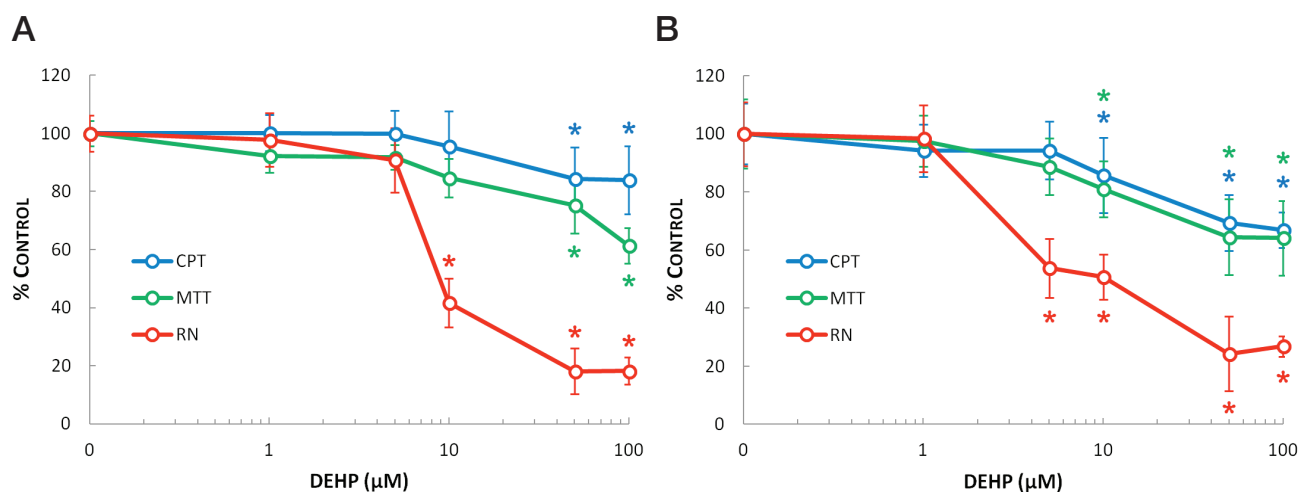


FIGURA 12. Citotoxicidad basal del DEHP en células Vero (A) y HaCaT (B) expuestas durante 24h a concentraciones crecientes del compuesto. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos en los diferentes ensayos: contenido de proteína celular total (CPT), reducción de la sal de tetrazolio MTT e incorporación de rojo neutro (RN). * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$).

Los estudios morfológicos se llevaron a cabo en paralelo a los ensayos de citotoxicidad basal con el objetivo de determinar si las alteraciones observadas en las pruebas bioquímicas se correspondían con cambios morfológicos en la integridad y/o patrón de distribución de los orgánulos celulares. En base a los resultados de dichas pruebas, para realizar estos estudios se seleccionaron las concentraciones de 10 y 100 μM de DEHP.

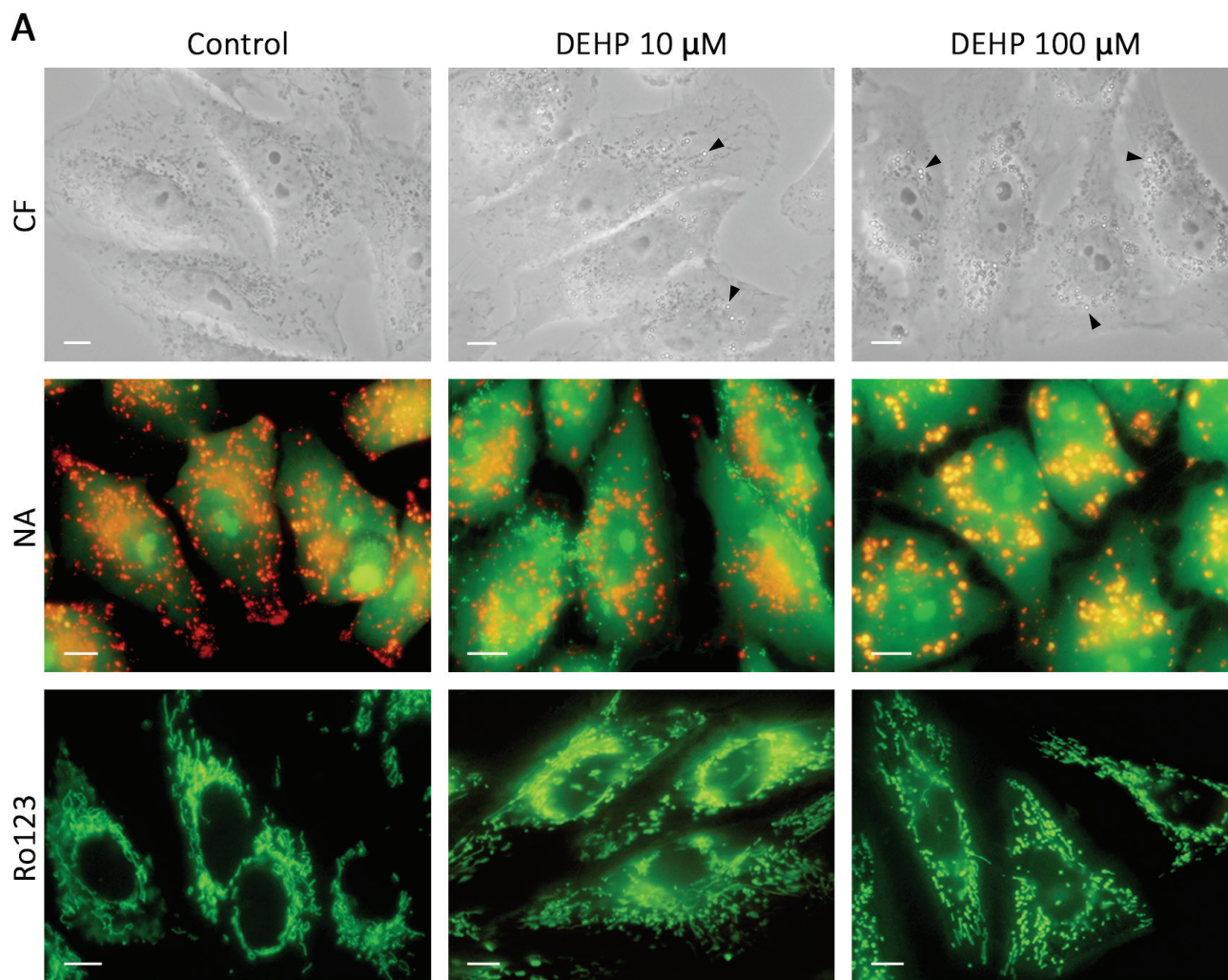


FIGURA 13. Estudio morfológico *in vivo* de células Vero (A) y HaCaT (B) expuestas 24h a DEHP 10 y 100 μM . Se muestran imágenes representativas de la morfología celular general en contraste de fase (CF), así como de la integridad del compartimento endosomal y el retículo mitocondrial mediante marcaje supravital con naranja de acridina (NA) y rodamina 123 (Ro123), respectivamente. Los tratamientos dieron lugar a la aparición de vesículas refringentes en el citoplasma (cabezas de flecha), la alcalinización del compartimento endosomal y una leve fragmentación del retículo mitocondrial. Escala 10 μm .

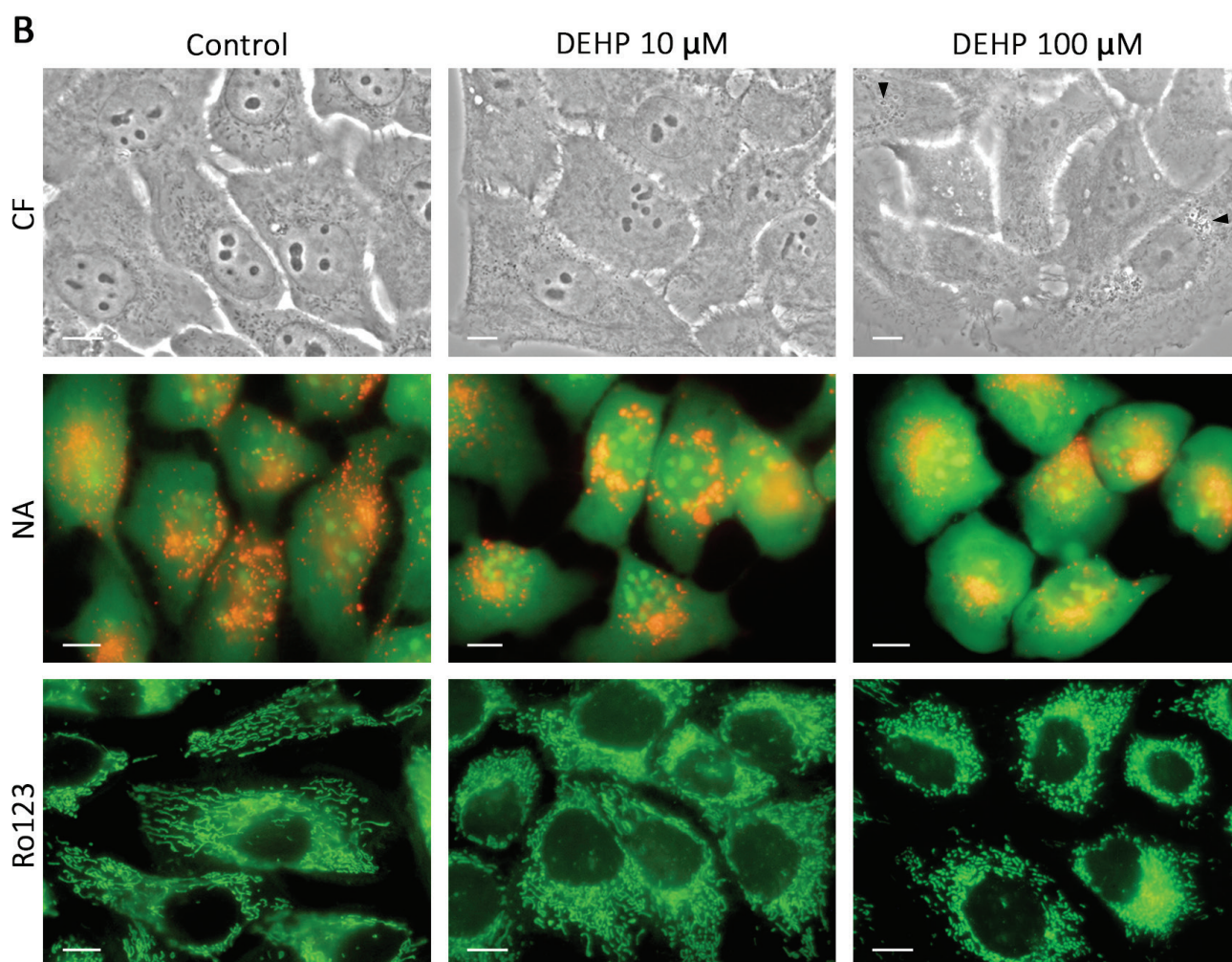


FIGURA 13. Estudio morfológico *in vivo* de células Vero (A) y HaCaT (B) expuestas 24h a DEHP 10 y 100 μM . Se muestran imágenes representativas de la morfología celular general en contraste de fase (CF), así como de la integridad del compartimento endosomal y el retículo mitocondrial mediante marcaje supravital con naranja de acridina (NA) y rodamina 123 (Ro123), respectivamente. Los tratamientos dieron lugar a la aparición de vesículas refringentes en el citoplasma (cabezas de flecha), la alcalinización del compartimento endosomal y una leve fragmentación del retículo mitocondrial. Escala 10 μm .

En la figura 13 se muestran imágenes representativas de células Vero (A) y células HaCaT (B) tratadas con DEHP y procesadas convenientemente para llevar a cabo la evaluación de la integridad morfológica de sus componentes. La morfología celular general se analizó a través de la observación directa de células vivas mediante microscopía óptica de contraste de fase (CF). Las células Vero control presentaron la morfología fibroblástica característica de

esta línea celular, con un citoplasma amplio y plano en el que se observan gran cantidad de orgánulos y se identifican con claridad el núcleo y los nucléolos. En el citoplasma de las células tratadas con DEHP 10 μM llamó especialmente la atención la presencia de vesículas refringentes, que aumentaron en número y tamaño en la concentración de 100 μM . En el caso de las células HaCaT, que en condiciones normales crecen agrupadas en colonias y muestran una característica morfología poligonal, la presencia de estas vesículas se observó en menor medida y sólo en la concentración de 100 μM .

La integridad del compartimento endosomal se analizó mediante marcaje supravital con el colorante naranja de acridina (AO). Los controles de las células Vero y HaCaT presentaron lisosomas de color rojo y/o anaranjado, propio de su contenido ácido. Este patrón se vio alterado por el DEHP desde 10 μM en ambas líneas celulares, aunque de forma más acusada en las células HaCaT. Se observó una leve tumefacción de los lisosomas acompañada de la relocalización del colorante, lo que se puso de manifiesto a causa de un aumento de la fluorescencia verde en el citoplasma. El efecto del DEHP sobre el compartimento endosomal resultó más severo en 100 μM , concentración en la que se pudo observar la alcalinización del contenido de estos orgánulos a través del viraje de su coloración hacia el amarillo, así como la presencia de lisosomas agregados en la región perinuclear, que en ningún caso se correspondieron con las vesículas observadas mediante contraste de fase.

R

La posible alteración del retículo mitocondrial se estudió mediante el marcaje con el colorante supravital rodamina 123 (Ro123). A diferencia de las células control de ambas líneas celulares, que presentaron las mitocondrias dispuestas en forma de retículo filamentoso, las células tratadas con DEHP 10 μM mostraron una fragmentación leve, que se hizo más acusada en la concentración de 100 μM , apareciendo también fenómenos de tumefacción en ambos tipos celulares.

Sobre la base de los resultados anteriores, para realizar los siguientes estudios se seleccionó la concentración de 100 μM de DEHP. Teniendo en cuenta que esta concentración redujo en más del 20% el contenido de proteína celular total en las dos líneas celulares utilizadas, se realizó un análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo, con el fin de valorar si el descenso de la densidad celular causado por los tratamientos con el compuesto se asociaba con un posible efecto antiproliferativo del mismo. En la línea celular Vero se observó una acumulación significativa de células en la fase G0/G1, acompañada de una disminución en las fases S y G2/M (Fig. 14A). Un perfil de ciclo celular muy similar se obtuvo para las células HaCaT (Fig. 14B). Si bien en estas últimas el porcentaje de células en fase G2/M se redujo significativamente, los cambios en la fracción G0/G1 y S no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Además, en esta línea se observó un ligero incremento significativo de la fracción sub-G1 apoptótica.

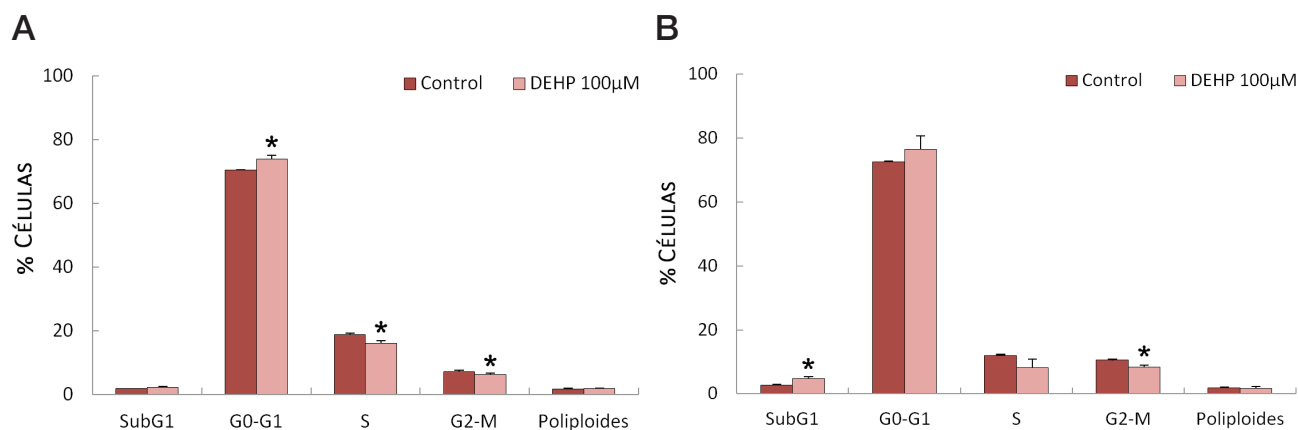


FIGURA 14. Efecto del DEHP sobre la progresión del ciclo celular de células Vero (A) y HaCaT (B) tras exposiciones de 24h a una concentración del compuesto de 100 µM. Se representan los valores medios (M±SD) obtenidos. * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$).

1.2. ALTERACIONES SUBCELULARES ASOCIADAS CON LA EXPOSICIÓN A DEHP

Dado que bajo determinadas condiciones las células pueden acumular en su citoplasma cantidades anormales de distintas sustancias, y con el objetivo de identificar las estructuras refringentes detectadas en el citoplasma de las células expuestas a DEHP por microscopía de CF, se llevaron a cabo dos técnicas de tinción clásicas para la detección de lípidos y glucógeno, dos de las principales moléculas que acumulan las células en respuesta a la acción tóxica de compuestos químicos.

El marcaje con rojo Nilo reveló la presencia de un punteado de color amarillo oro distribuido por el citoplasma de las células tratadas con DEHP 100 µM durante 24 horas (Fig. 15A), lo que indicaba que la exposición al compuesto daba lugar a la acumulación de inclusiones o gotas lipídicas (CLDs, *Cytosolic Lipid Droplets*) en las dos líneas celulares estudiadas. Cabe señalar que estas gotas mostraron el mismo patrón que las vesículas refringentes observadas en contraste de fase. Por su parte, la reacción del PAS, mediante la cual es posible detectar acumulaciones citoplasmáticas de glucógeno, resultó positiva sólo en células Vero tratadas con DEHP, como se puede observar en la figura 15B.

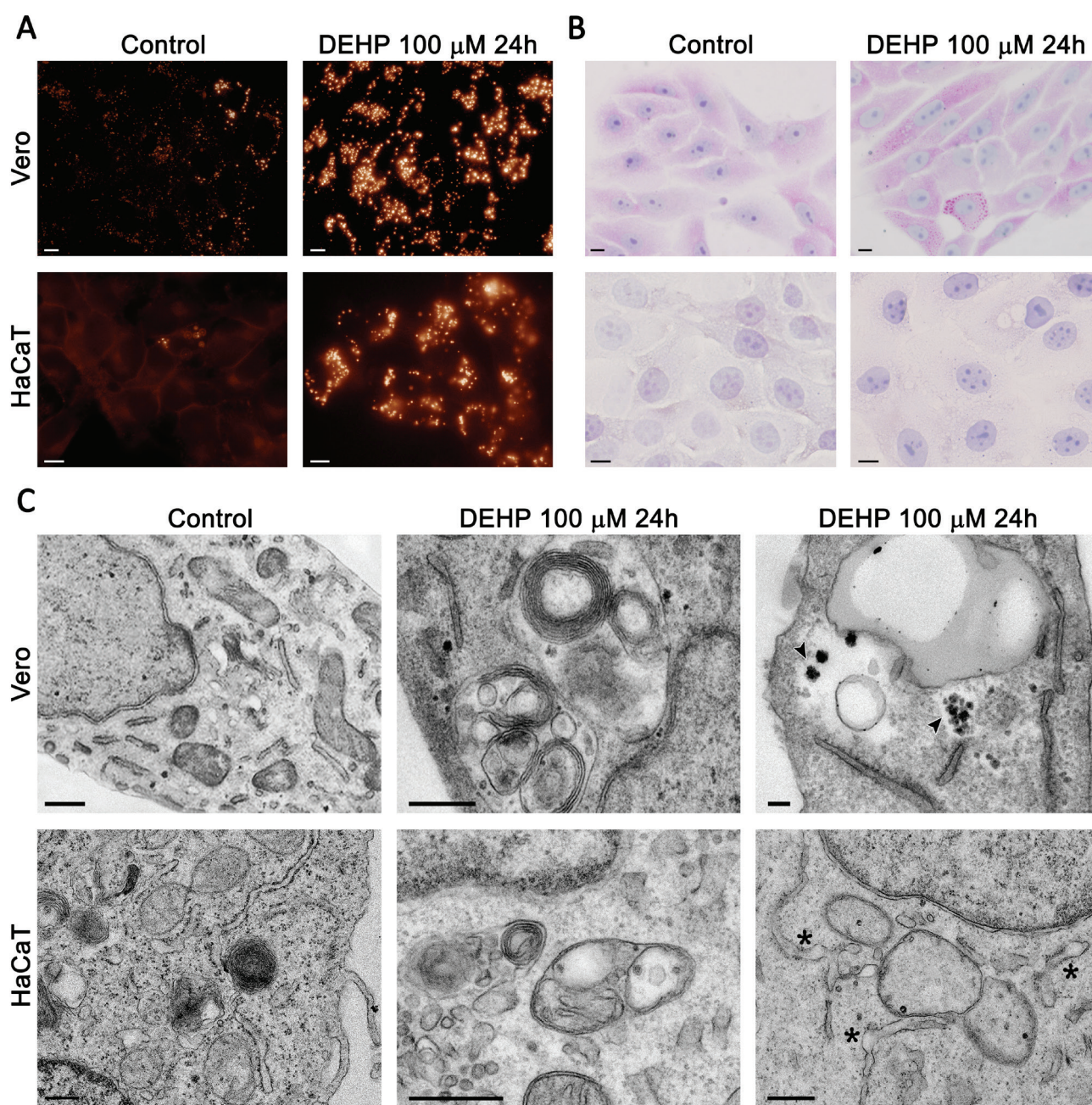


FIGURA 15. Alteraciones subcelulares de células Vero y HaCaT expuestas 24h a DEHP 100 µM. (A) Detección de gotas lipídicas mediante tinción con Rojo Nilo. (B) Marcaje de acumulaciones de glucógeno mediante la reacción del PAS. (C) Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión. Las cabezas de flecha indican los depósitos de glucógeno intracelular (partículas α) en células Vero y los asteriscos muestran dilatación del RE en células HaCaT. Escalas 10 µm (A y B) y 0.5 µm (C).

Con el fin de obtener un conocimiento más profundo de las alteraciones subcelulares observadas en las células tratadas con el compuesto, se llevaron a cabo estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET). Las células Vero no tratadas presentaron una ultraestructura normal, con cromatina laxa y orgánulos bien conservados. Tras los tratamientos con DEHP 100 μ M prácticamente todas las células examinadas mostraron autolisosomas pleiomórficos con contenido celular amorfo y/o estructuras multilamelares, lo que resultaba compatible con procesos de autofagia. Además, en el citoplasma de estas células se observó un marcado exceso de glucógeno, tanto en forma de partículas β como en rose-tas (partículas α), y se confirmó la existencia de inclusiones lipídicas. La ultraestructura de las células HaCaT también se vio alterada como consecuencia de los tratamientos con DEHP. Entre las características más reseñables destacaron la presencia de mitocondrias dañadas en el interior de vesículas autofágicas, la aparición de inclusiones lipídicas y la dilatación de cisternas del retículo endoplásmico (Fig. 15C).

1.3. ANÁLISIS DE MARCADORES DE ESTRÉS DE RETÍCULO TRAS LA EXPOSICIÓN A DEHP

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió valorar a continuación la posible interferencia del DEHP con la fisiología del retículo endoplásmico (RE). Para evaluar la posible inducción de estrés de RE por este plastificante se analizaron por western blot los niveles de expresión de dos marcadores críticos de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*): la proteína de la familia de las chaperonas GRP78/BiP y el factor de transcripción proapoptótico CHOP/GADD153. En las células Vero, los niveles de GRP78 se incrementaron ligeramente tras 4 horas de exposición a DEHP 100 μ M y se duplicaron con respecto al control a las 24 horas. Por el contrario, los niveles de CHOP no se vieron alterados tras las primeras 4 horas de tratamiento y se redujeron ligeramente respecto al control en el tiempo de exposición más largo (Fig. 16A). En las células HaCaT, el DEHP provocó un notable aumento respecto al control en los niveles de GRP78 y CHOP a las 4 horas, seguido de una leve reducción de la cantidad de proteína a las 24 horas (Fig. 16B).

Se investigó a continuación si los cultivos celulares expuestos a DEHP mostraban una expresión alterada de la proteína Bcl-2 antiapoptótica, un modulador clave en la señalización de la muerte celular. Como se muestra en la figura 16A, tras 24 horas de tratamiento con el compuesto las células Vero mostraron niveles de Bcl-2 2.8 veces por encima de los controles. Por su parte, en la línea celular HaCaT se detectó un incremento en los niveles de esta proteína tras 4 horas de exposición y una reducción del 50% con respecto al control después de 24 horas de tratamiento (Fig. 16B).

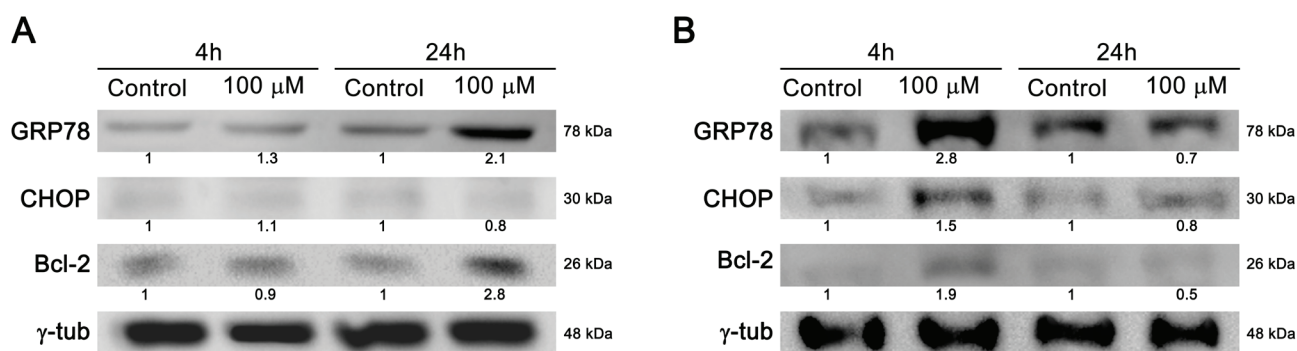


FIGURA 16. Análisis por *Western blot* de marcadores de estrés de RE en células Vero (A) y HaCaT (B) tratadas con DEHP 100 μM durante 4h y 24h. Se indican los valores de inducción relativa, que expresan la cantidad de proteína presente en las muestras tratadas con respecto a las muestras no tratadas, tras la normalización de la carga con respecto a la proteína γ-tubulina. Las imágenes son representativas de un mínimo de tres experimentos independientes.

1.4. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL DEHP

- El DEHP ejerce un efecto citotóxico dependiente de dosis en las líneas celulares Vero y HaCaT. El ensayo de citotoxicidad basal más sensible es el RN, lo que coincide con las pruebas morfológicas y señala al compartimento endosomal como una diana preferente del compuesto.
- Los tratamientos con DEHP 100 μM dan lugar a alteraciones en la progresión del ciclo celular de células de mamífero en cultivo. Se observa una disminución significativa de la fracción G2/M tanto en células Vero como HaCaT, acompañada de un incremento de células en G0/G1 en el primer caso y de la fracción sub G1 apoptótica en el segundo.
- El análisis de las alteraciones subcelulares inducidas por DEHP pone de manifiesto la presencia de inclusiones lipídicas en el citoplasma de las células expuestas al plastificante. En el caso de las células de origen renal, se observa además la acumulación de glucógeno en forma de rosetas. Los estudios de ultraestructura confirman los resultados de microscopía óptica y evidencian la presencia de cisternas del RE dilatadas tanto en células Vero como HaCaT, así como la inducción de procesos de autofagia en el caso de la primera línea celular.
- El análisis de proteínas por Western blot demuestra que los tratamientos con DEHP 100 μM inducen la expresión de marcadores de respuesta a proteínas mal plegadas, con un patrón de expresión temporal diferente en función del tipo celular.

2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD POR EXPOSICIÓN PROLONGADA: EL TRICLOSÁN

La evaluación toxicológica del TCS se inició con la determinación de su citotoxicidad basal en las líneas celulares de origen humano HaCaT, MDA-MB-231 y MCF7, exponiendo las células durante 24 horas a concentraciones crecientes de TCS en el rango de 1 a 100 μM .

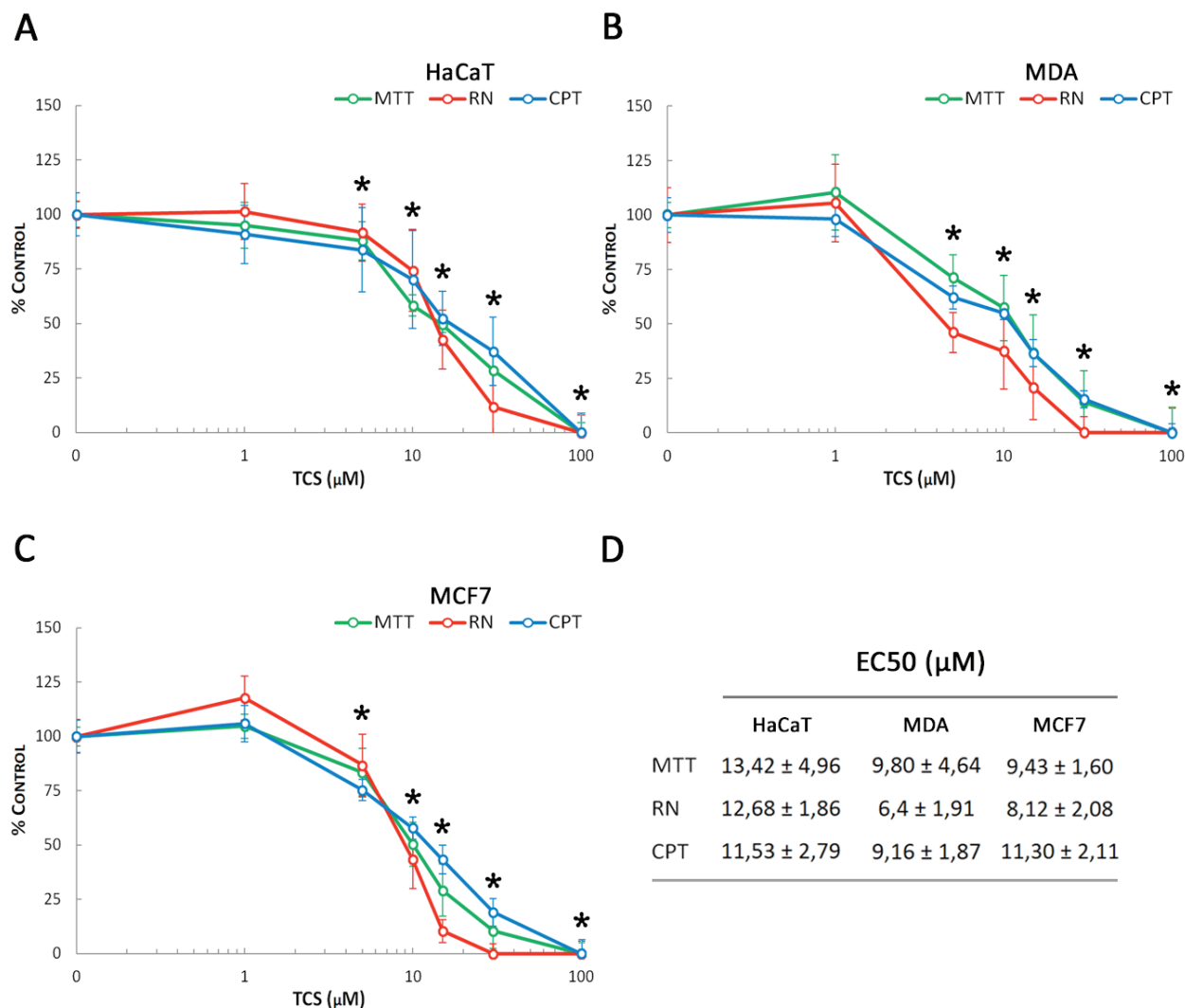


FIGURA 17. Citotoxicidad basal del TCS en células HaCaT (A), MDA (B) y MCF7 (C) expuestas durante 24h a concentraciones crecientes del compuesto. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos en los diferentes ensayos: contenido de proteína celular total (CPT), reducción de la sal de tetrazolio MTT e incorporación de rojo neutro (RN). Se incluyen los valores de EC_{50} ($M \pm SD$) para cada uno de los ensayos (D). * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0,05$).

Los resultados de las pruebas cuantitativas (RN, MTT y CPT) mostraron que el TCS induce una fuerte respuesta citotóxica dependiente de dosis con un perfil muy similar en los tres tipos celulares, obteniéndose diferencias significativas respecto al control desde 5 μM y valores de EC_{50} en torno a 10 μM en todos los ensayos utilizados (Fig. 17). Si bien el ensayo de RN resultó ser el más sensible, tanto éste como el MTT mostraron estar estadísticamente correlacionados de forma significativa con el ensayo de CPT (Tabla 12), que constituye una medida indirecta del número de células presentes en el cultivo, demostrándose la existencia de un claro efecto antiproliferativo del TCS.

R Pearson	HaCaT	MDA	MCF7
MTT - CPT	0.82*	0.97*	0.97*
RN - CPT	0.79*	0.93*	0.97*

TABLA 12. Análisis de correlación de los ensayos de viabilidad con respecto al contenido de proteína celular total en las líneas celulares estudiadas.
* Correlaciones estadísticamente significativas.

2.1. EFECTOS DEL TCS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Una vez caracterizado el perfil de citotoxicidad basal del TCS, se planteó una estrategia experimental en la que se redujo el rango de concentraciones a evaluar (0-2 μM) y se aumentó el tiempo de exposición al compuesto. A efectos comparativos, se seleccionaron dos concentraciones de los ensayos de 24 horas: 1 μM (la menor utilizada) y 10 μM (valor promedio de los EC_{50}).

Para controlar la evolución de los cultivos, se realizaron ensayos de CPT mediante el método de Bradford cada 24 horas, hasta alcanzar un tiempo total de 120 horas. Desde las 72 horas de exposición continua a TCS, las tres líneas celulares mostraron un incremento respecto al control de la cantidad de proteína en las concentraciones de 0.5 μM en HaCaT y 1 μM en MDA y MCF7. Este incremento no fue significativo hasta las 120 horas (Fig. 18), condición que se seleccionó para realizar los estudios de exposición prolongada.

Con el fin de valorar el efecto del compuesto sobre la progresión del ciclo celular, se llevaron a cabo estudios de citometría de flujo en diferentes condiciones experimentales: a) 24 horas de exposición y concentraciones de TCS de 0.5 o 1 μM y 10 μM ; y b) 120 horas de exposición y concentraciones de 0.5 o 1 μM y 2 μM . La concentración seleccionada menor (0.5 μM para las células HaCaT y 1 μM para las células MDA y MCF7) se correspondió con el incremento significativo de proteína detectado mediante en ensayo de CPT a las 120 horas de exposición.

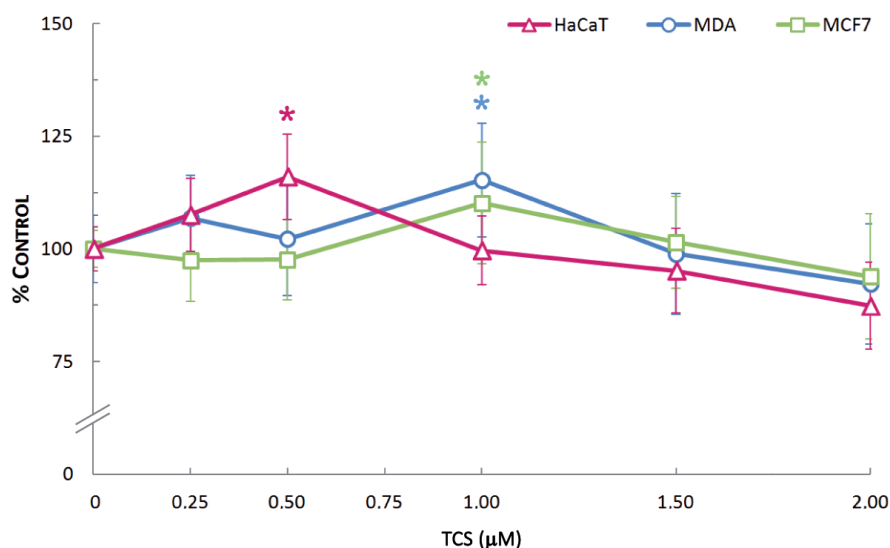


FIGURA 18. Efecto del TCS sobre el contenido de proteína celular total de células HaCaT, MDA y MCF7 expuestas al compuesto durante 120h. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos. * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$).

Como se muestra en la figura 19, las tres líneas celulares estudiadas mostraron alteraciones del ciclo celular después de los distintos tratamientos con TCS. Las células HaCaT expuestas a TCS 0.5 μ M durante 24 horas mostraron un incremento no significativo de células en la fase G0/G1, así como una disminución significativa de la fracción S, no observándose cambios en el resto de fases del ciclo celular en esta condición experimental (Fig. 19A). Esta tendencia resultó muy similar en las células MDA, que presentaron un aumento significativo en la fracción G0/G1, acompañado de una reducción del número de células en S en los tratamientos de 24 horas con TCS 1 μ M (Fig. 19C). En estas mismas condiciones, la línea celular MCF7 únicamente mostró una disminución significativa del porcentaje de células en la fracción G0/G1, no observándose cambios en el resto de etapas del ciclo celular (Fig. 19E). Por su parte, los tratamientos de 24 horas con TCS 10 μ M dieron lugar a respuestas distintas en función del tipo celular utilizado. Como se observa en la figura 19A, las células HaCaT mostraron una disminución significativa del porcentaje de células en G0/G1, acompañada de una reducción significativa de la fase S y un leve, aunque no significativo, descenso del porcentaje de células en G2/M. Las células MDA evidenciaron un aumento significativo de la fracción G0/G1 así como disminuciones estadísticamente significativas de las fracciones S y G2/M (Fig. 19B). La línea celular MCF7 presentó una disminución significativa del porcentaje de células en G0/G1 y G2/M, acompañada de un aumento significativo de células en S (Fig. 19C). Como característica común de los tratamientos de 24 horas con TCS 10 μ M, las tres líneas celulares presenta-

ron un importante incremento del porcentaje de células en la fracción sub-G1 apoptótica, que resultó más evidente en las células HaCaT (29.2%) y MDA (17.1%) que en las MCF7 (3.1%).

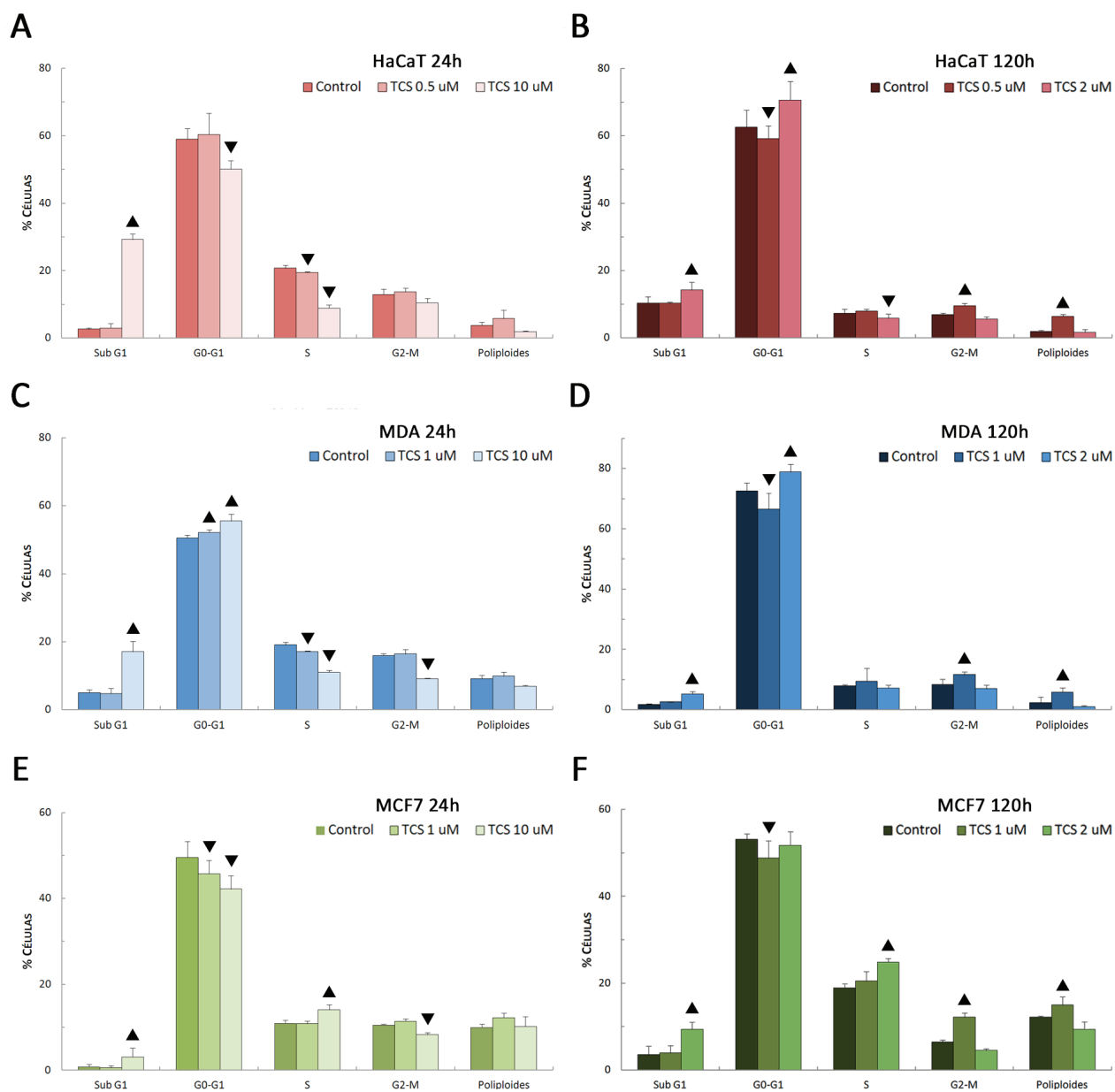


FIGURA 19. Efecto del TCS sobre la progresión del ciclo celular de células humanas en cultivo. (A) Células HaCaT tratadas 24h con TCS 0.5 y 10 μ M. (B) Células HaCaT tratadas 120h con TCS 0.5 y 2 μ M. (C) Células MDA tratadas 24h con TCS 1 y 10 μ M. (D) Células MDA tratadas 120h con TCS 1 y 2 μ M. (E) Células MCF7 tratadas 24h con TCS 1 y 10 μ M. (F) Células MCF7 tratadas 120h con TCS 1 y 2 μ M. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos. Incrementos (\blacktriangle) y descensos (\blacktriangledown) significativos con respecto al control ($p \leq 0.05$).

Los tratamientos con TCS 0.5/1 μM durante 120 horas dieron lugar a resultados muy similares en las tres líneas celulares estudiadas, observándose una reducción significativa del porcentaje de células en la fase G0/G1, acompañada de un incremento estadísticamente significativo en la fase G2/M y en el número de células poliploides. No se observaron variaciones con respecto al control en la fracción S ni en la sub-G1 en esta condición experimental (Fig. 19B,D,F). Los tratamientos con 2 μM dieron lugar al aumento de células en la fracción sub-G1 apoptótica en todas las líneas celulares, así como al incremento de la fase G0/G1 en células HaCaT y MDA, y de la fase S en células MCF7. En esta condición experimental no se observaron cambios con respecto al control ni en la fracción G2/M ni el número de células poliploides.

Para tener una visión más completa de los efectos del TCS sobre la proliferación celular, se llevaron a cabo recuentos de índice mitótico (IM) bajo las mismas condiciones experimentales que los análisis de citometría de flujo. Se realizaron asimismo estudios de crecimiento de los cultivos celulares, mediante el recuento directo del número de células tras 72 y 120 horas de tratamiento con TCS 0.5/1 μM , concentración en la que se había detectado el incremento de proteína, de G2/M y de células poliploides en todas las líneas celulares.

Los recuentos de IM se realizaron sobre células marcadas con anti- α -tubulina y núcleos contrateñidos con Hoechst 33258, lo que permite la observación conjunta del citoesqueleto de microtúbulos y el ADN, facilitando la identificación de las distintas fases de la mitosis (Fig. 20C).

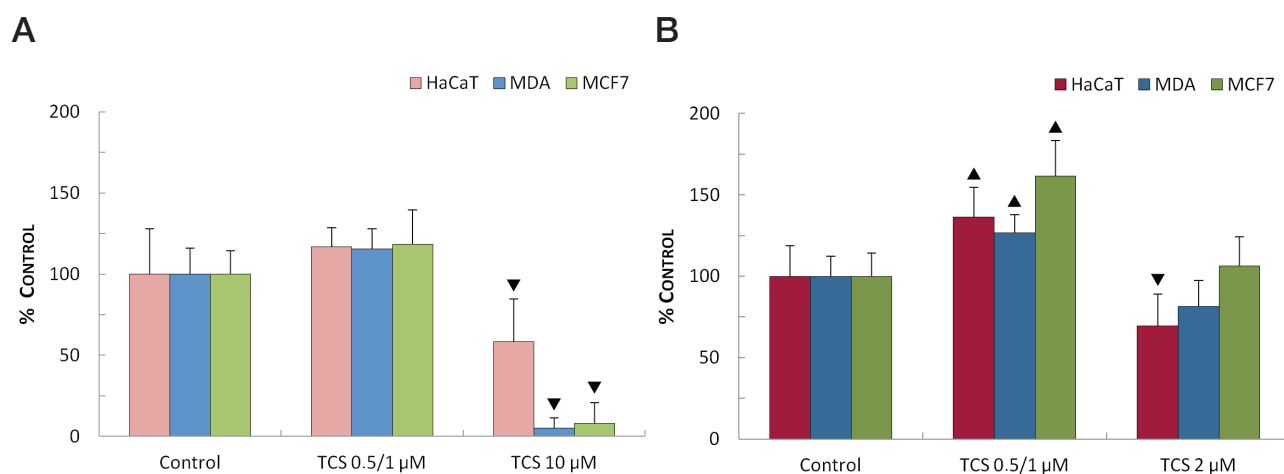


FIGURA 20. Efecto del TCS sobre la tasa de división celular. Se representan los valores de índice mitótico ($M \pm SD$) de células HaCaT, MDA y MCF7 expuestas a distintas concentraciones de TCS durante 24h (A) y 120h (B). Incrementos (▲) y descensos (▼) significativos con respecto al control ($p \leq 0.05$). (C) Imágenes representativas de células HaCaT control, en interfase y en división, marcadas con anti- α -tubulina (α -Tub) y Hoechst 33258 (Ho). Escala 10 μm .

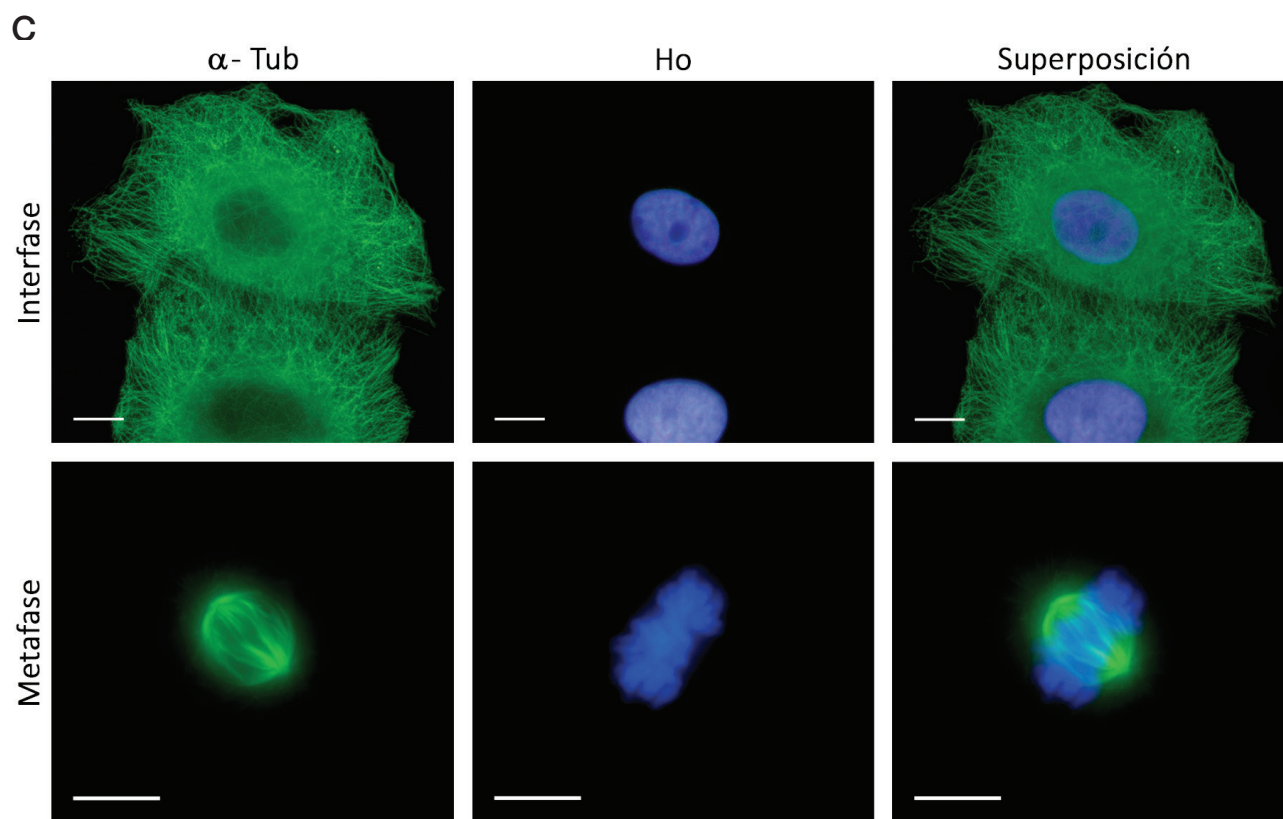


FIGURA 20. Efecto del TCS sobre la tasa de división celular. Se representan los valores de índice mitótico ($M \pm SD$) de células HaCaT, MDA y MCF7 expuestas a distintas concentraciones de TCS durante 24h (A) y 120h (B). Incrementos (\blacktriangle) y descensos (\blacktriangledown) significativos con respecto al control ($p \leq 0.05$). (C) Imágenes representativas de células HaCaT control, en interfase y en división, marcadas con anti- α -tubulina (α -Tub) y Hoechst 33258 (Ho). Escala 10 μ m.

Como se observa en la figura 20A, las células tratadas con TCS durante 24 horas sólo mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control en la concentración de 10 μ M, donde se produjo una considerable reducción de la tasa de división celular en los tres tipos celulares. Por su parte, los tratamientos de 120 horas evidenciaron un incremento significativo de la tasa de división celular en las células expuestas a TCS 0.5/1 μ M, observándose incrementos de IM del 36.30%, 26.63% y 61.55% en HaCaT, MDA y MCF7, respectivamente. Los tratamientos con TCS 2 μ M sólo alteraron la tasa de división celular de las células HaCaT, cuyo IM se redujo con respecto al control de forma estadísticamente significativa (Fig. 20B). En cuanto al citoesqueleto de microtúbulos, ninguna de las condiciones experimentales evaluadas dio lugar a alteraciones de esta estructura subcelular, ni en células en interfase ni en células en división.

Los estudios de crecimiento celular, realizados mediante el recuento directo del número de células viables en un hemocitómetro, demostraron que los cultivos tratados con TCS 0.5/1 μM durante 120 horas presentaban un número de células significativamente mayor que los cultivos control en todos los tipos celulares analizados (Fig. 21A-C).

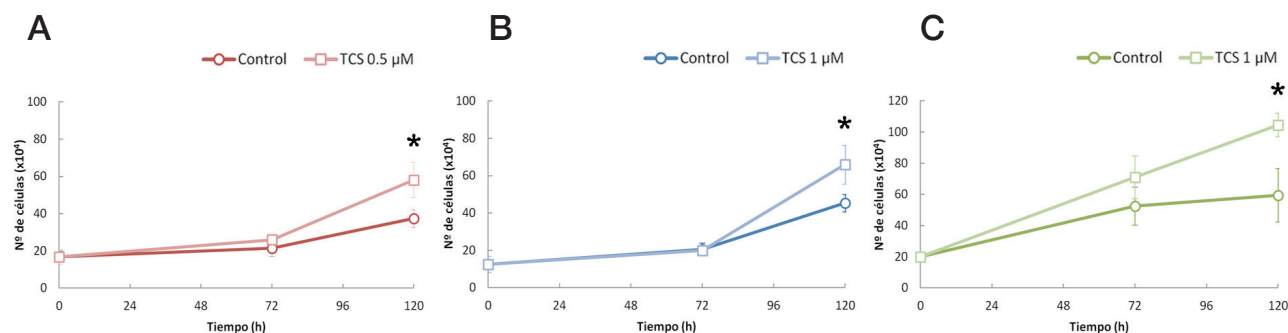


FIGURA 21. Medida de la proliferación de células HaCaT (A), MDA (B) y MCF7 (C) mediante recuento directo de células viables ($M \pm SD$). Para cada línea celular, se representa la evolución del cultivo control en comparación con el tratado con TCS 0.5 (HaCaT) o 1 μM (MDA, MCF7) durante 72h y 120h. * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$).

2.2. ANÁLISIS ESPECÍFICO DE DAÑO AL ADN TRAS LA EXPOSICIÓN A TCS

Para evaluar la posible inducción de daño genotóxico por TCS se llevaron a cabo inmunodetecciones específicas contra 8-OHdG e histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) en células HaCaT, MDA y MCF7 tratadas con el compuesto durante 24 y 120 horas.

Los resultados correspondientes a la cuantificación sobre imagen de la señal de 8-OHdG se muestran en la figura 22. Los tratamientos de 24 horas dieron lugar al marcaje positivo de las células en todas las condiciones experimentales estudiadas, duplicándose los valores de 8-OHdG ya desde la menor concentración utilizada (Fig. 22A). La presencia de bases de ADN oxidadas es indicativa de la inducción de estrés oxidativo desde 0.5/1 μM en las tres líneas celulares. Los tratamientos de 120 horas también dieron lugar a un aumento significativo del porcentaje de bases oxidadas en las tres líneas celulares analizadas (Fig. 22B). En esta condición experimental, los tratamientos con TCS 0.5/1 μM evidenciaron un incremento más moderado de la señal de 8-OHdG en comparación con la condición de 24 horas, observándose aumentos respecto al control del 21.1%, 19.8% y 24.7% en HaCaT, MDA y MCF7, respectivamente. Por su parte, los tratamientos con TCS 2 μM dieron lugar a incrementos con respecto al control de aproximadamente el 50% en las tres líneas celulares.

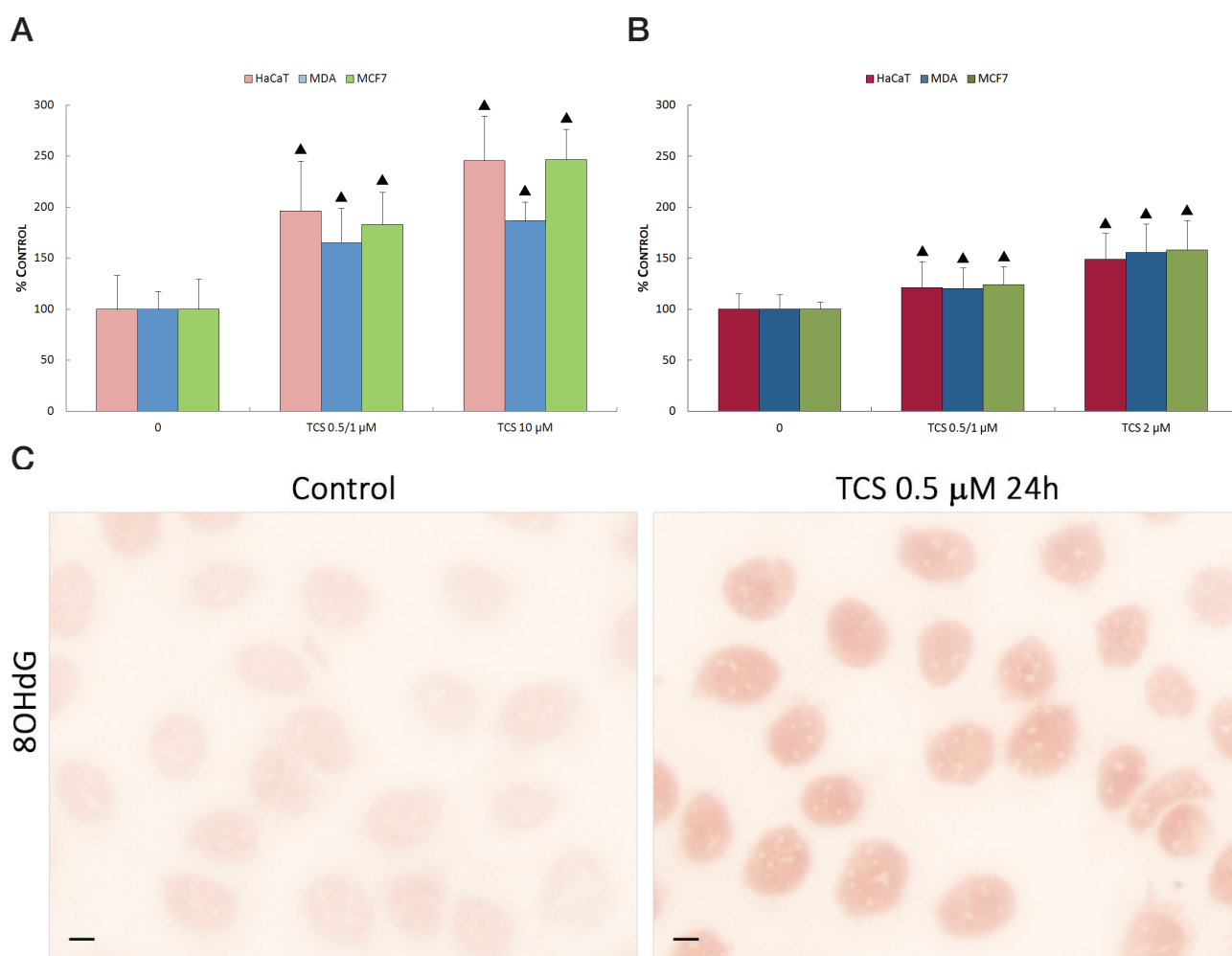


FIGURA 22. Detección del daño oxidativo al ADN mediante el marcaje inmunocitoquímico de 8-OHdG. Se representa el porcentaje con respecto al control ($M \pm SD$) del índice de 8-OHdG en células HaCaT, MDA y MCF7 expuestas a TCS durante 24h (A) 120h (B). Incrementos (▲) y descensos (▼) significativos con respecto al control ($p \leq 0.05$). (C) Imágenes representativas de células HaCaT control y tratadas. Escala 10 μ m.

Los resultados de la detección específica de γ -H2AX, que señala la presencia de roturas de doble cadena en el ADN, mostraron que tras 24 horas de exposición a TCS los tratamientos de 0.5/1 μ M y 10 μ M incrementaron de forma muy significativa el índice de dobles roturas en las células HaCaT, MDA y MCF7 (Fig. 23A). Este incremento también se pudo detectar después de los tratamientos de 120 horas con TCS 2 μ M en los tres tipos celulares estudiados. Sin embargo, las células expuestas a TCS 0.5/1 μ M durante 120 horas no mostraron aumento alguno del índice basal de dobles roturas, manteniéndose éste en valores similares al de los controles,

al contrario de lo ocurrido después de las primeras 24h de tratamiento (Fig. 23B). En la figura 23C se muestran imágenes representativas de núcleos control y núcleos positivos a γ -H2AX.

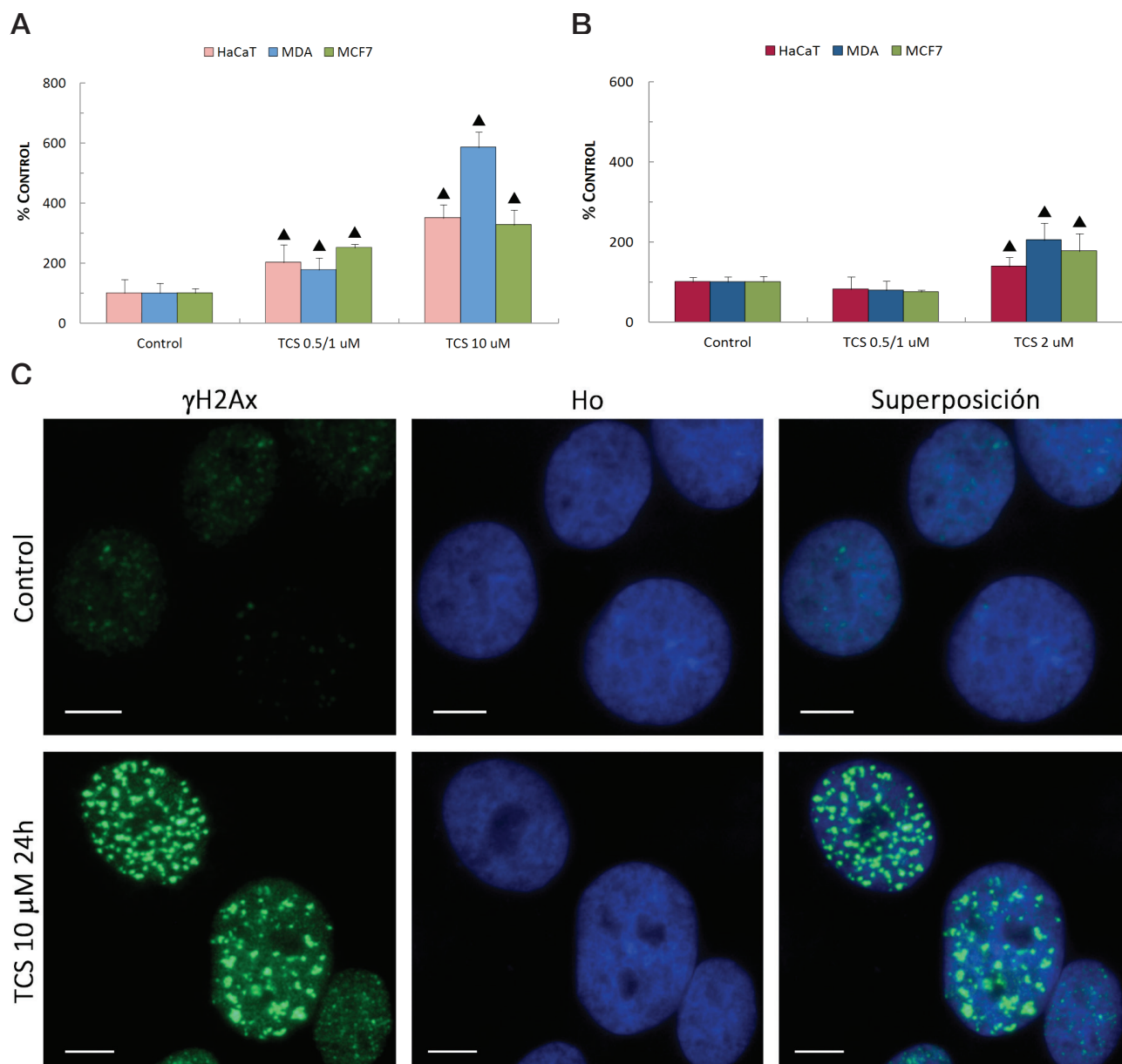


FIGURA 23. Detección específica de roturas de doble cadena de ADN mediante marcaje inmunofluorescente contra γ -H2AX y contratinción de núcleos con Hoechst 33258 (Ho). Se representan los porcentajes (M \pm SD) de células HaCaT, MDA y MCF7 marcadas positivamente tras la exposición a TCS durante 24h (A) 120h (B). Incrementos (\blacktriangle) y descensos (\blacktriangledown) significativos con respecto al control ($p \leq 0.05$). (C) Imágenes representativas de células HaCaT control y tratadas. Escala 10 μ m.

2.3. APROXIMACIÓN GENÓMICA PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TCS

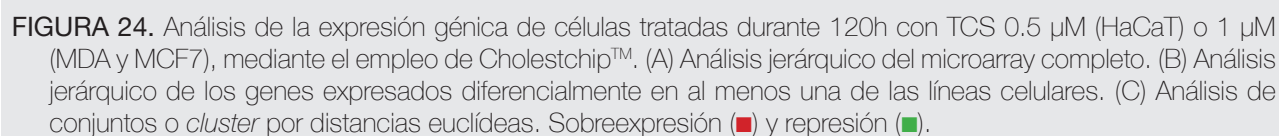
Con el fin de aproximarnos a las respuestas moleculares asociadas a exposiciones prolongadas y bajas dosis de TCS, decidimos emplear una potente herramienta de análisis de expresión génica basada en microarrays de ADNc. Para el estudio a gran escala de los cambios asociados a la exposición a TCS utilizamos un microrarray especialmente dirigido al estudio del metabolismo lipídico y el ciclo celular, conocido comercialmente como Choleschip™. Realizamos el estudio tanto en células HaCaT como en MDA y MCF7, seleccionando la concentración de 0.5 µM en el primer caso y 1 µM en los dos restantes, y un tiempo de exposición al compuesto de 120 horas.

El resultado de hibridación del microarray fue óptimo en las tres líneas celulares, obteniéndose señal detectable en el 100% de los genes (319) presentes en el Choleschip™ (Fig. 24A). Una vez establecido un umbral de Log₂ Cy5/Cy3 de ±0.75, obtuvimos un total de 48 genes expresados diferencialmente en al menos uno de los tres tipos celulares analizados (Fig. 24B). Como se muestra en la figura 24C, el análisis de conjuntos o *cluster* por distancias euclídeas para HaCaT, MDA y MCF7 permitió reconocer nueve grupos de genes. De forma general, no se obtuvieron patrones de expresión iguales en los tres tipos celulares (Tabla 13), con excepción del *cluster* 3, que mostró 4 genes reprimidos en las tres condiciones de estudio.

Nº de genes	MDA	HaCaT	MCF7
Sobreexpresados	6	4	15
Reprimidos	8	8	15

TABLA 13. Número de genes por línea celular cuya expresión se vio alterada significativamente después de 120 horas de exposición a TCS 0.5/1 µM.

De los genes expresados diferencialmente, casi el 20% (10) se correspondieron con secuencias relacionadas con el ciclo celular y la gran mayoría de los restantes se relacionaban con el metabolismo lipídico. En estos últimos los resultados no mostraron una tendencia clara. Entre los que presentaron un perfil de expresión similar en las tres líneas celulares, encontramos genes implicados en el transporte y el metabolismo de ácidos grasos y colesterol, así como algunos relacionados con procesos de obesidad. A pesar de la variedad de resultados, en general se pudo observar una represión de los genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos y la β-oxidación (SLC27A5, CPT2 y FABP2), así como de transportadores lipídicos relacionados con la síntesis de colesterol (FDPS y ERG25). Por el contrario, genes relacionados con homeostasis de lípidos y con procesos de obesidad aparecen tanto sobreexpresados (Factor D) como reprimidos (ANGPTL4).



Respecto a los genes relacionados con el ciclo celular, la mayor parte de ellos se vieron alterados en la línea MCF7, bien sobreexpresados (CCNA2), bien reprimidos (CDKN1C/p57). Cabe destacar que dichos genes presentaron una tendencia similar, aunque de menor intensidad y no significativa, en las otras dos líneas celulares. También se vio alterada en al menos un tipo celular la expresión de algunos genes de interleuquinas (ILB1, IL12B) y de isoformas de p450 (CYP2B6, CYP7A1). Por último, señalar que el gen GADD45A, que codifica para la proteína con el mismo nombre (*Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 alpha*) y que está relacionada con la respuesta de estrés y el daño al ADN, estaba reprimido en las tres líneas celulares, aunque de manera significativa únicamente en las células MCF7.

2.4. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL TCS

- La evaluación de la toxicidad aguda del TCS evidencia una fuerte respuesta citotóxica dependiente de dosis en las líneas celulares HaCaT, MDA y MCF7. Los ensayos de viabilidad (RN y MTT) muestran una buena correlación con el ensayo de contenido de CPT, lo que indica un efecto antiproliferativo del TCS en nuestras condiciones experimentales.
- Los efectos del TCS sobre la proliferación celular resultan distintos al reducir la concentración y aumentar el tiempo de exposición al compuesto. Los tratamientos con bajas dosis de TCS (0.5 μM en HaCaT y 1 μM en MDA y MCF7) durante 120h dan lugar al aumento de las tasas de división celular, de forma que los cultivos tratados presentan mayor número de células que los controles, así como IM más elevados.
- Los análisis específicos de daño al ADN demuestran que el TCS es capaz de producir daño genotóxico en las células HaCaT, MDA y MCF7 tras 24h de exposición al compuesto. La presencia de daño oxidativo al ADN y de dobles roturas también se evidencia después de los tratamientos de 120h con TCS 2 μM . Sin embargo, los tratamientos en los que se observa el efecto mitogénico (0.5 μM en HaCaT y 1 μM en MDA y MCF7) no muestran señal alguna de daño, al contrario de lo ocurrido durante las primeras 24h de tratamiento.
- El estudio a gran escala de los cambios de expresión génica asociados a la exposición a TCS demuestra que el 16% de los genes se expresa diferencialmente en al menos una de las líneas celulares tras 120h de tratamiento con TCS 0.5/1 μM . De éstos, un 20% se corresponden con secuencias relacionadas con el ciclo celular y la gran mayoría de los restantes están relacionados con el metabolismo lipídico.

3. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD RETARDADA: EL ÁCIDO PERFLUOROOCCTANOICO

3.1. VALORACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL PFOA

La evaluación *in vitro* de los posibles efectos citotóxicos del PFOA se llevó a cabo en las líneas celulares HeLa y HaCaT, utilizando un diseño experimental que incluía tres condiciones de exposición al compuesto. En primer lugar, se valoró la citotoxicidad basal del PFOA después de: a) 24 horas de exposición continua al compuesto; b) 24 horas de exposición al compuesto y 48 horas de crecimiento en medio de cultivo libre de éste (24+48 horas); y c) 72 horas de exposición continua al compuesto. Estos estudios se realizaron en paralelo, utilizando en todos los casos concentraciones de PFOA de 10, 50, 100, 250 y 500 μM .

En la figura 25 se muestran las curvas dosis-respuesta de los distintos tratamientos de PFOA, agrupadas en función del tipo de ensayo (CPT, MTT y RN). En células HeLa, el ensayo de CPT mostró una reducción significativa de la cantidad de proteína celular total a partir de 100 μM en los tres tiempos de exposición evaluados. Esta disminución resultó más acusada partir de 250 μM , especialmente en los tratamientos de 72 horas. Además, los tratamientos de 24 horas y 24+48 horas presentaron una toxicidad equivalente entre sí, a pesar de que en la segunda condición experimental las células permanecieron 48 horas en un medio de cultivo libre de PFOA (Fig. 25A). Los ensayos de viabilidad (MTT y RN) mostraron una respuesta muy similar a la observada con el test de CPT. Tanto el MTT como el RN mostraron descensos significativos de viabilidad a partir de 100 μM en los tres tiempos de exposición analizados. Se observó que a partir de 250 μM , la exposición continua a PFOA durante 72 horas resultó más citotóxica que las demás condiciones experimentales y que los valores de viabilidad tras la retirada del compuesto durante 48 horas fueron equivalentes a los de los tratamientos de 24 horas (Fig. 25C,E).

El ensayo de CPT en la línea celular HaCaT mostró diferencias significativas respecto al control a partir de 100 μM en los tres tiempos de exposición a PFOA. Al igual que en las células HeLa, no se observaron diferencias entre las curvas dosis-respuesta de 24 horas y 24+48 horas (Fig. 25B). En cuanto a los ensayos de viabilidad, la capacidad de reducción del MTT disminuyó respecto al control a partir de 250 μM en los tratamientos de 24 horas y 24+48 horas, que una vez más presentaron curvas de toxicidad similares, y a partir de 50 μM en los tratamientos de 72 horas de duración (Fig. 25D). El ensayo de RN mostró una tendencia muy similar a la del MTT excepto en los tratamientos de PFOA 50 μM , en los que se pudo observar una leve reversión del efecto producido a las 24 horas tras retirar el compuesto del medio de cultivo de las células (Fig. 25F).

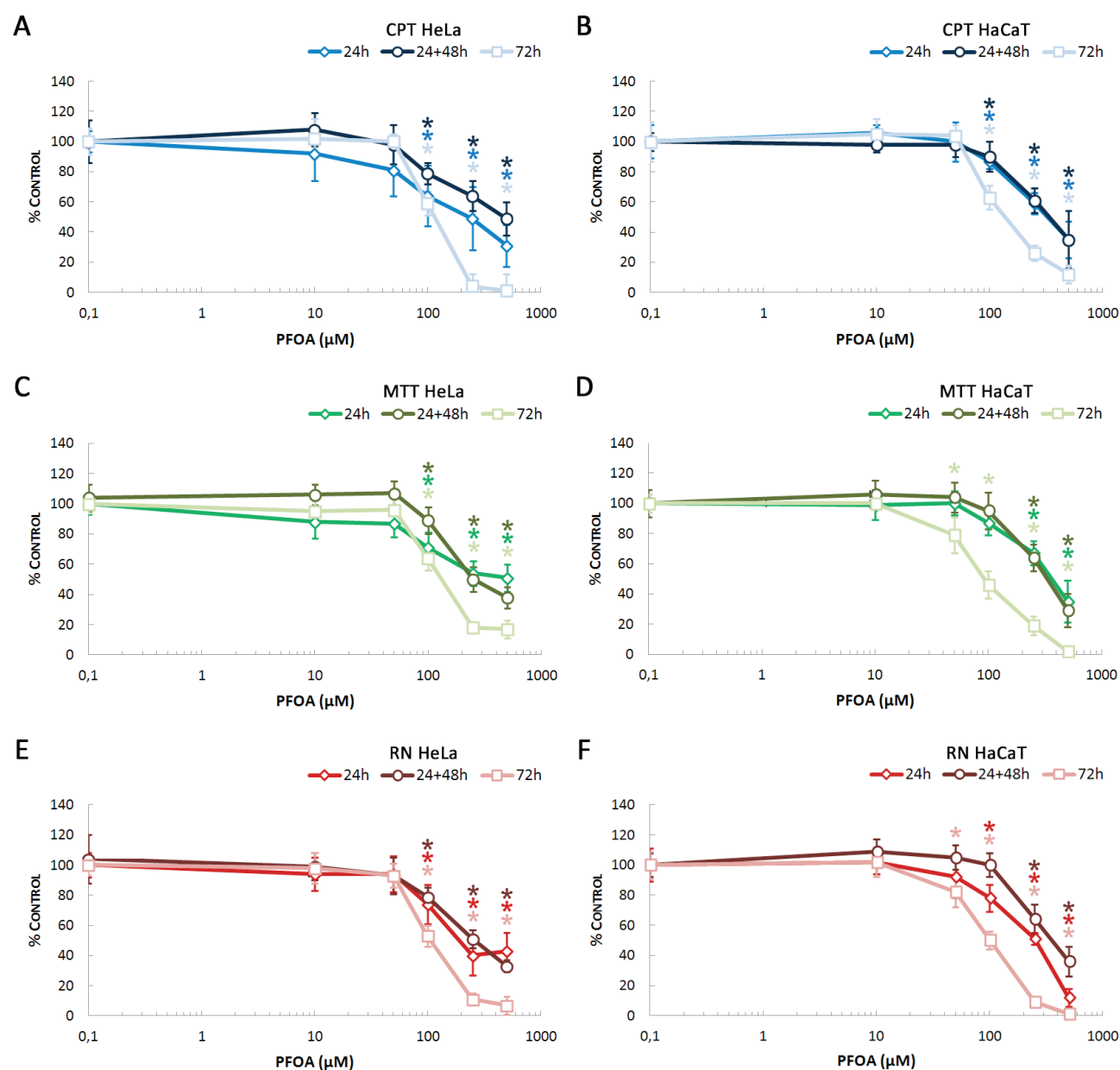


FIGURA 25. Citotoxicidad basal del PFOA en células HeLa (A, C y E) y HaCaT (B, D y F) expuestas a concentraciones crecientes del compuesto durante 24h, 24+48h y 72h. Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos en los diferentes ensayos: contenido de proteína celular total (CPT), reducción de la sal de tetrazolio MTT e incorporación de rojo neutro (RN). * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$).

En general, el PFOA ejerció una citotoxicidad moderada en las células HeLa y HaCaT, obteniéndose diferencias significativas respecto al control a partir de 100 μM y valores de EC50 superiores a 150 μM en la mayor parte de los parámetros analizados. Si bien la condición experimental que resultó más citotóxica fue la de 72 horas de exposición continua, es importante destacar que los efectos provocados por el compuesto a las 24 horas no revirtieron a la situación control con su retirada del medio de cultivo y que todas las condiciones de exposición mostraron estar correlacionadas significativamente (Tabla 14).

R Pearson	BRD			MTT			RN		
	24h vs. 24+48h	24h vs. 72h	72h vs. 24+48h	24h vs. 24+48h	24h vs. 72h	72h vs. 24+48h	24h vs. 24+48h	24h vs. 72h	72h vs. 24+48h
HeLa	0.77*	0.80*	0.81*	0.82*	0.86*	0.89*	0.83*	0.89*	0.91*
HaCaT	0.91*	0.90*	0.86*	0.85*	0.83*	0.85*	0.89*	0.93*	0.84*

TABLA 14. Análisis de correlación entre las distintas condiciones de exposición a PFOA (24h, 24+48h y 72h) para cada ensayo de citotoxicidad basal llevado a cabo en las líneas celulares HeLa y HaCaT. * Correlaciones estadísticamente significativas.

Los estudios de citotoxicidad del PFOA se complementaron con un análisis de morfología celular general mediante microscopía óptica de contraste de fase. Se seleccionaron las concentraciones de 50 y 100 μM y los tiempos de exposición de 24 horas, 24+48 horas y 72 horas. En la figura 26 se muestran a modo de ejemplo imágenes representativas de células HeLa y HaCaT tratadas con PFOA 50 μM en las tres condiciones experimentales mencionadas. Las células HeLa, que en condiciones normales presentan una morfología poligonal con los límites de la membrana plasmática bien definidos y el citoplasma extendido, mostraron alteraciones morfológicas en todas las condiciones experimentales analizadas. Desde 50 μM , los distintos tiempos de exposición dieron lugar a fenómenos de retracción celular, que resultaron más evidentes en los tratamientos de 72 horas, así como a la aparición progresiva de alteraciones en la membrana en forma de ampollas o *blebs*. Estas estructuras aparecieron de forma incipiente en los tratamientos de 24 horas con PFOA 50 μM . A medida que aumentó la concentración y/o el tiempo de exposición se intensificó el efecto, resultando equivalentes las alteraciones observadas a las 24+48 horas y las 72 horas. En las células HaCaT, las alteraciones morfológicas se manifestaron de forma más discreta, apareciendo pequeñas vacuolas en el citoplasma de las células tratadas con PFOA durante 24+48 horas y 72 horas, así como una leve tumefacción turbia en esta última condición experimental, que se intensificó con los tratamientos de 100 μM .

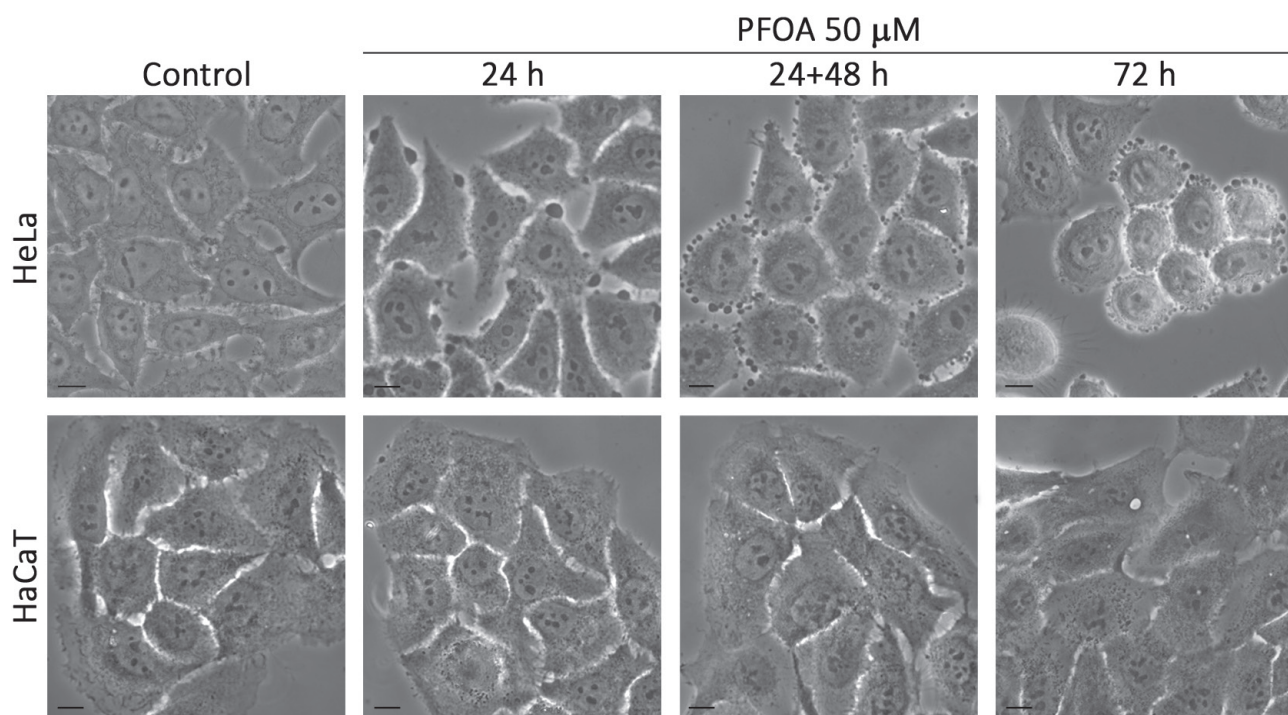


FIGURA 26. Morfología celular general de células HeLa y HaCaT expuestas a PFOA durante 24h, 24+48h y 72h. Se muestran, a modo de ejemplo, imágenes representativas de los tratamientos con PFOA 50 μ M. En células HeLa destacan los fenómenos de retracción celular y la presencia de alteraciones en la membrana en forma de *blebs*. En células HaCaT se observa la aparición de pequeñas vacuolas citoplasmáticas y una leve tumefacción turbia en los tratamientos más prolongados. Escala 10 μ m.

Uno de los resultados más llamativos fue la visualización de los *blebs* en la membrana plasmática de las células HeLa tratadas con PFOA, por lo que decidimos realizar un estudio más detallado para caracterizar los procesos asociados a la aparición de estas estructuras. Las condiciones experimentales ensayadas fueron las mismas que las de los estudios de morfología celular general. En la figura 27 se resumen los resultados de las distintas pruebas realizadas, habiéndose seleccionado a modo de ejemplo imágenes representativas de los tratamientos con PFOA 50 μ M durante 24+48 horas.

En primer lugar, con el objetivo de determinar si las células que presentaban *blebs* eran viables o no, se valoró la integridad de la membrana plasmática mediante el marcaje *in vivo* con bromuro de etidio y naranja de acridina (BE/NA). De forma general, las células viables incorporan el colorante NA y excluyen el BE, quedando su citoplasma marcado en verde. Por el contrario, las células no viables permiten el paso del BE a través de su membrana, quedando

do éste finalmente intercalado en el ADN, de manera que el núcleo queda marcado en rojo. Como se observa en la figura 27-BE/NA, las células tratadas con PFOA resultaron negativas al marcaje con BE en todas las condiciones de exposición analizadas, mostrando una coloración verde en su citoplasma a pesar de la evidente presencia de *blebs*. Si bien en los tratamientos de 72 horas con PFOA 100 μ M se pudo identificar alguna célula marcada como el control positivo (células expuestas 10 minutos a Triton® X-100 0.5%), de forma general se observó que los tratamientos con el compuesto no perturbaron significativamente la integridad de la membrana plasmática de las células HeLa.

Teniendo en cuenta que los fenómenos de *blebbing* generalmente se asocian a procesos de muerte celular, decidimos a continuación realizar una inmunodetección contra caspasa 3 activa, un marcador temprano de procesos apoptóticos. Los resultados fueron negativos en todas las condiciones experimentales, apareciendo anecdóticamente alguna célula positiva en los tratamientos de 72 horas con PFOA 100 μ M, que identificamos como tal por presentar una señal fluorescente verde más intensa y equivalente a la de los controles positivos (células crecidas 24 horas en medio de cultivo sin suero) (Fig. 27-Caspasa 3/Ho).

El patrón de microfilamentos de actina, relacionado con la integridad de la membrana plasmática y la adhesión celular, se valoró mediante la detección específica de esta proteína con faloidina conjugada con TRITC. Las células HeLa control presentan una fuerte marca cortical de microfilamentos de actina, así como algunas fibras de estrés dispersas en su citoplasma. El marcaje de las células tratadas con PFOA reveló que, a pesar de la retracción y de la presencia de *blebs*, estas células mantenían la marca de actina cortical. La observación en detalle de estos preparados permitió comprobar que las estructuras que protruían de la membrana en forma de ampollas estaban rodeadas de actina, mostrando en ocasiones una señal más intensa en la región del cuello del *bleb* (Fig. 27-Actina/Ho). También se comprobó que con el aumento de la concentración y/o del tiempo de exposición a PFOA, también aumentó la intensidad del *blebbing*, llegando a observarse vesículas escindidas de la célula rodeadas por completo de la marca de actina.

Por último, se realizó una inmunodetección contra anexina A1, una proteína relacionada con los procesos de reparación de la membrana plasmática. Como se refleja en la figura 27-Anexina A1/Ho, las células tratadas con PFOA mostraron un incremento de la señal de anexina A1 que, aunque de forma general mostró un patrón de distribución citoplasmático, también aparecía específicamente alrededor de los *blebs* y, en ocasiones, en la región del cuello de éstos.

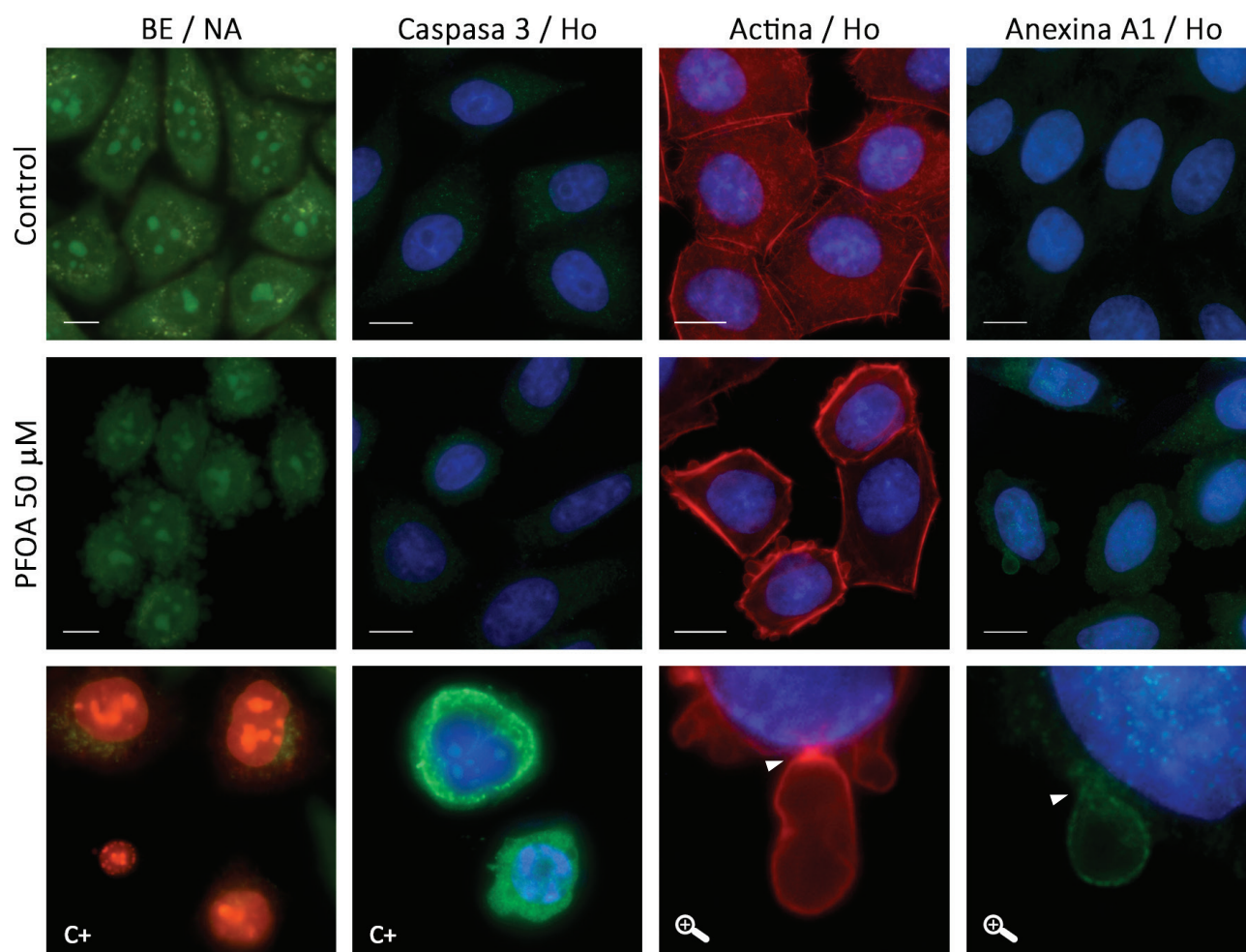


FIGURA 27. Estudio mediante microscopía óptica de epifluorescencia de los procesos celulares asociados a la aparición de *blebs* en células HeLa tratadas con PFOA. Se valoró la integridad de la membrana plasmática mediante marcaje *in vivo* con bromuro de etidio y naranja de acridina (BE/NA), la posible aparición de procesos apoptóticos mediante inmunodetección contra caspasa 3 activa, el estado del citoesqueleto de actina mediante detección específica de esta proteína con faloidina conjugada con TRITC y la aparición de procesos de reparación de la membrana plasmática mediante inmunodetección contra anexina A1. En estos tres últimos casos los núcleos se contratiñeron con Hoechst 33258 (Ho). Se muestran asimismo imágenes representativas de controles positivos (C+) para las dos primeras pruebas y detalle (🔍) de los *blebs* en las dos últimas. Las cabezas de flecha señalan el cuello del *bleb*, donde se observa una señal más intensa tanto de actina como de anexina A1. Escala 10 µm.

3.2. EFECTOS DEL PFOA SOBRE LA TASA DE DIVISIÓN CELULAR

Las muestras destinadas a los análisis morfológicos mediante microscopía óptica de epi-fluorescencia estaban contrateñidas con el intercalante de ADN Hoechst 33258, de forma que el núcleo de las células resultaba visible. Esta circunstancia permitió detectar una posible alteración de la tasa de división celular como consecuencia de los distintos tratamientos con PFOA. Por este motivo, se decidió realizar un estudio más exhaustivo de este parámetro mediante recuentos de IM sobre células marcadas con α -tubulina y Hoechst 33258. La clasificación de las células en las distintas fases del ciclo celular (interfase, profase, metafase, anafase y telofase) se realizó siguiendo los criterios morfológicos clásicos.

En la figura 28 se muestran los resultados de los recuentos de IM en células HeLa y células HaCaT. Las células HeLa mostraron un efecto muy similar en los tres tiempos de exposición evaluados. Tanto los tratamientos de 24 horas como los de 24+48 horas y 72 horas mostraron un incremento significativo del IM en los tratamientos con PFOA 50 μ M. Este incremento fue consecuencia principalmente del aumento de células en profase y metafase. De forma general y con la excepción de PFOA 100 μ M 24+48, el resto de concentraciones de PFOA provocaron el descenso del IM en todos los tiempos experimentales ensayados, especialmente en las exposiciones de 72 horas (Fig. 28A,C,E).

Muy similar fue el efecto del compuesto en la línea celular HaCaT, observándose aumentos en el número de células mitóticas en todos los tratamientos con PFOA 50 μ M como consecuencia del incremento de las fases de la mitosis previas a anafase. Al igual que en las células HeLa, a partir de 100 μ M se observó una disminución significativa de la tasa de división celular en todos los tiempos de exposición evaluados (Fig. 28B,D,F).

El análisis morfológico del patrón de microtúbulos se realizó tanto en células HeLa como HaCaT, seleccionando la concentración de PFOA 50 μ M. Los resultados fueron muy similares independientemente de la línea celular y del tiempo de exposición al compuesto, por lo que en la figura 29 se muestran a modo de ejemplo imágenes representativas de los efectos del PFOA sobre el citoesqueleto de microtúbulos de células HeLa tratadas con PFOA 50 μ M durante 24+48 horas. Estas imágenes reflejan perfectamente los resultados obtenidos en los recuentos de IM, observándose un incremento del número de células en división en los cultivos tratados con PFOA 50 μ M, en comparación con los controles. La observación detallada de estas divisiones permitió identificar la presencia de abundantes prometafases y metafases que, en ocasiones, exhibían cromosomas no congregados o mal distribuidos.

Estos resultados, junto con el hecho de que en las mismas condiciones no se detectó previamente un incremento de la proteína celular total mediante el ensayo de Bradford, indican que el PFOA provoca un retraso en la fase M del ciclo celular.

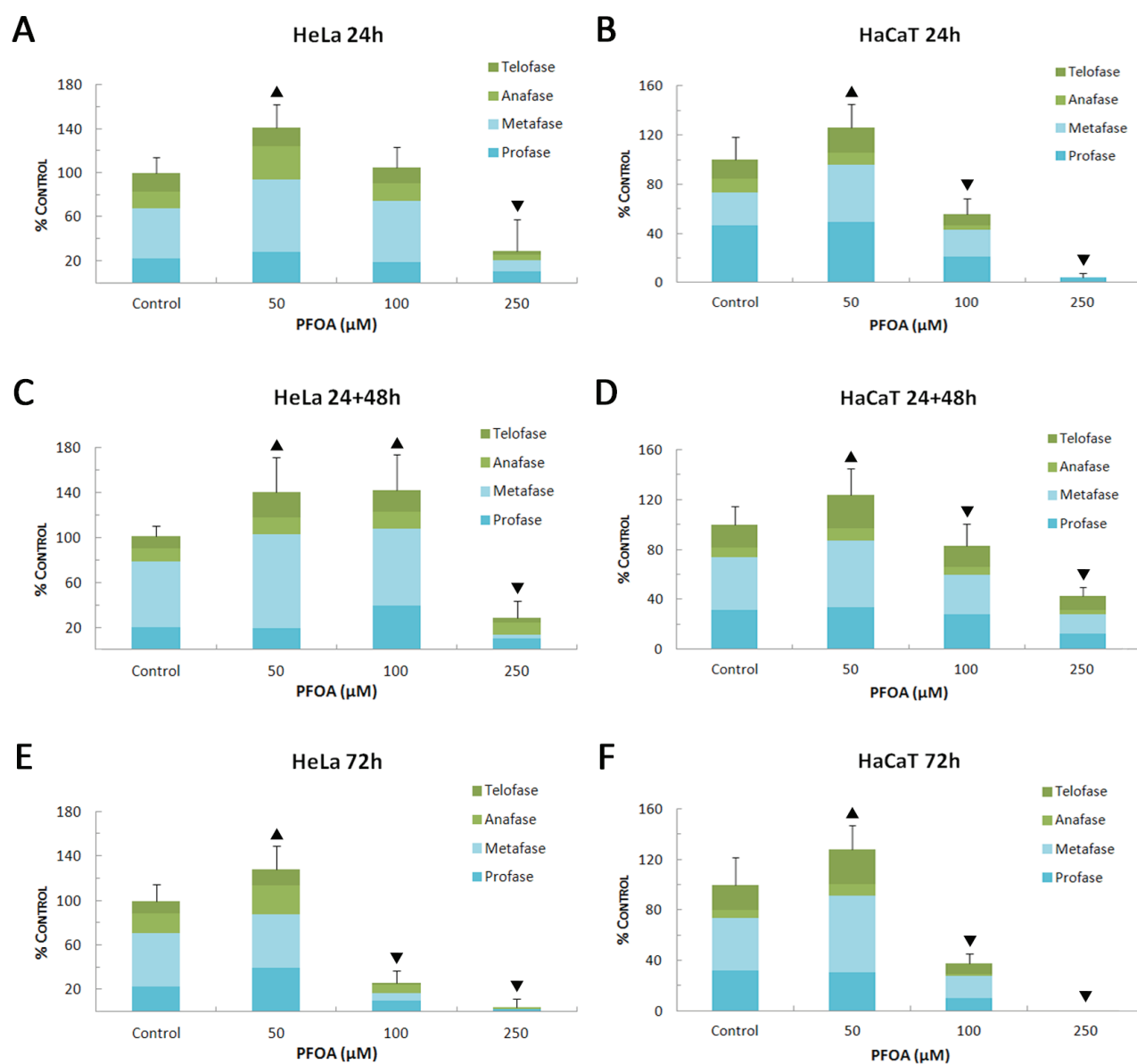


FIGURA 28. Recuentos de IM en células HeLa (A, C y E) y HaCaT (B, D, y F) expuestas a concentraciones crecientes de PFOA durante 24h, 24+48h y 72h. Se representa la tasa de división como porcentaje respecto al control ($M \pm SD$), así como el porcentaje relativo de células en cada una de las fases de la mitosis. Incrementos (▲) y descensos (▼) significativos con respecto al control ($p \leq 0.05$).

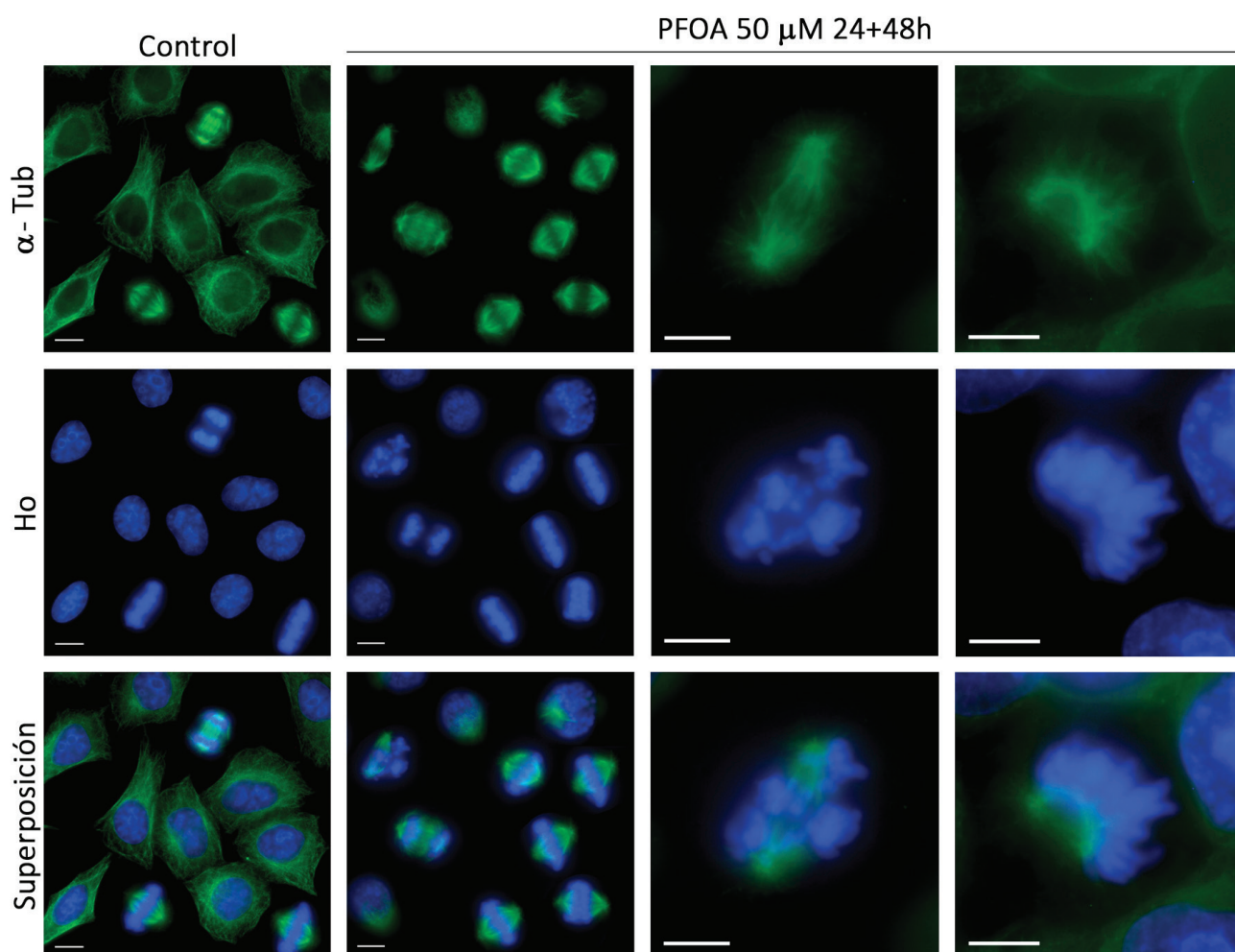


FIGURA 29. Análisis morfológico del patrón de microtúbulos de células HeLa expuestas a PFOA, mediante inmunodetección específica de α -tubulina (α -Tub) y contratinción de núcleos con Hoechst 33258 (Ho). Se muestran, a modo de ejemplo, imágenes representativas de los tratamientos de 24+48h, en las que se observa un incremento en el número de células en mitosis, así como la presencia de cromosomas no congregados (imágenes de mayor aumento). Escala 10 μ m.

3.3. ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS CELULARES ASOCIADAS A LA RETIRADA DEL PFOA

El efecto de PFOA 50 μ M sobre el IM tuvo lugar desde las primeras 24 horas de tratamiento y se mantuvo durante al menos 72 horas, independientemente de si el compuesto permanecía de forma continuada en el medio de cultivo de las células o de si era remplazado durante 48 horas por un medio de cultivo libre de droga. En este punto, se decidió valorar el efecto de la retirada del PFOA del medio de cultivo durante un periodo prolongado de tiempo, con el objetivo de estudiar la evolución de los cultivos que habían sufrido el retraso en la fase M del ciclo celular. Para ello, células HeLa y HaCaT expuestas a PFOA 50 μ M durante 24 horas fueron mantenidas en un medio de cultivo libre del compuesto durante 8 días.

Transcurrido este periodo de tiempo, se realizó un análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron que las células HeLa tratadas con PFOA 24 horas y crecidas durante 8 días en medio de cultivo libre del compuesto presentaban un perfil de ciclo celular similar al del control, no observándose diferencias significativas en ninguna de las fases éste (Fig. 30A). En estas mismas condiciones, las células HaCaT sufrieron un incremento significativo del porcentaje de células en la fracción G0/G1, acompañado de una disminución de las fases S y G2/M, así como un leve incremento no significativo del número de células poliploides. No se observaron diferencias en el porcentaje de células en la fracción sub-G1 apoptótica (Fig. 30B).

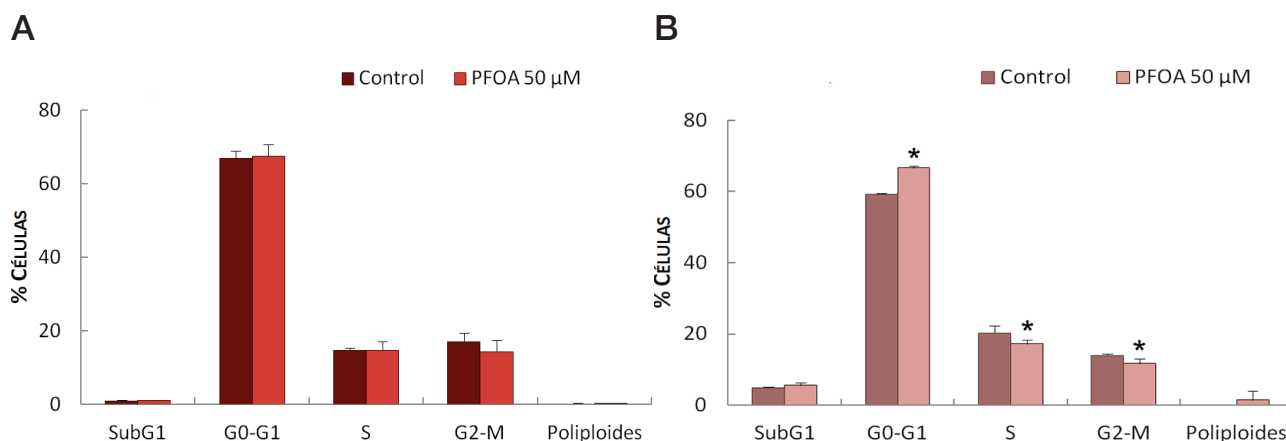


FIGURA 30. Análisis del ciclo celular de células HeLa (A) y HaCaT (B) tratadas con PFOA durante 24h y crecidas los 8 días posteriores en medio de cultivo libre del compuesto. Se representan las frecuencias relativas ($M \pm SD$) de células en cada fase del ciclo, obtenidas mediante citometría de flujo. * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$).

En base a estos resultados, se decidió valorar la posible inducción de procesos de senescencia celular mediante la detección citoquímica de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) y se cuantificó sobre imagen el número de células positivas al marcaje. Los resultados revelaron que sólo las células HaCaT presentaban incrementos significativos respecto al control de la señal de esta enzima, lo que indica la presencia de células senescentes en estos cultivos (Fig. 31).

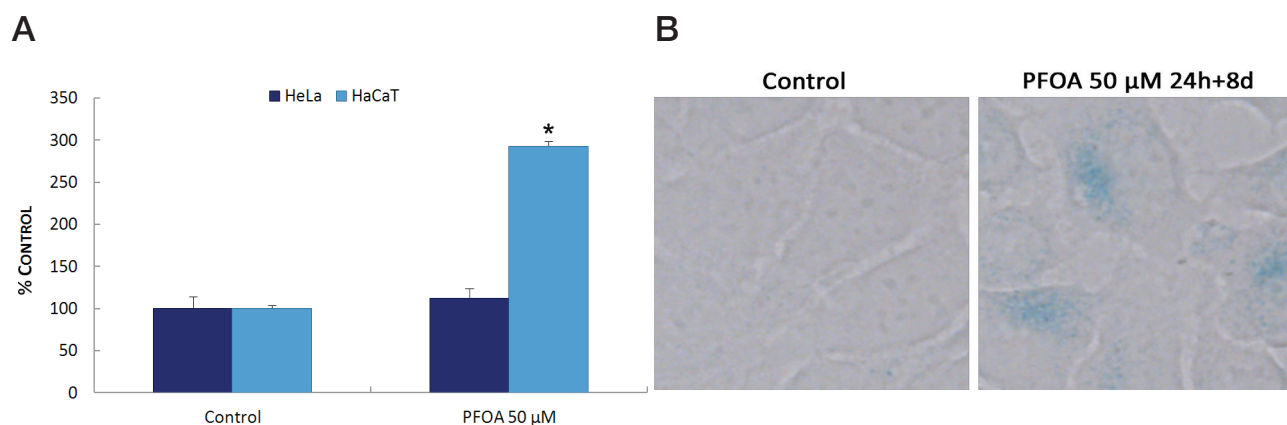


FIGURA 31. Valoración de la inducción de procesos senescentes en células HeLa y HaCaT tratadas con PFOA 50 µM durante 24h y crecidas los 8 días posteriores en medio de cultivo libre del compuesto. Se representa como porcentaje respecto al control ($M \pm SD$) el número de células positivas a la actividad de la enzima β -galactosidasa (A). Imágenes representativas de células HaCaT control y tratadas (B). * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$).

Por último, con el objetivo de determinar la presencia de estrés oxidativo a partir de la detección de bases oxidadas de ADN, se llevó a cabo una inmunodetección específica contra 8-OHdG después de los tratamientos con PFOA 50 µM durante 24 horas y 24 horas más 8 días de recuperación. Los tratamientos de 24 horas dieron lugar al marcaje positivo de las células HeLa, que mostraron incrementos muy importantes de los niveles de 8-OHdG. Por su parte, las células HaCaT presentaron un incremento más moderado, aunque significativo, de la señal de bases de ADN oxidadas (Fig. 32A). Los resultados tras 8 días de crecimiento en medio libre de PFOA fueron algo distintos, obteniéndose en esta ocasión niveles de 8-OHdG iguales a los del control en el caso de las células HeLa e incrementos estadísticamente significativos en el caso de las células HaCaT (Fig. 32B).

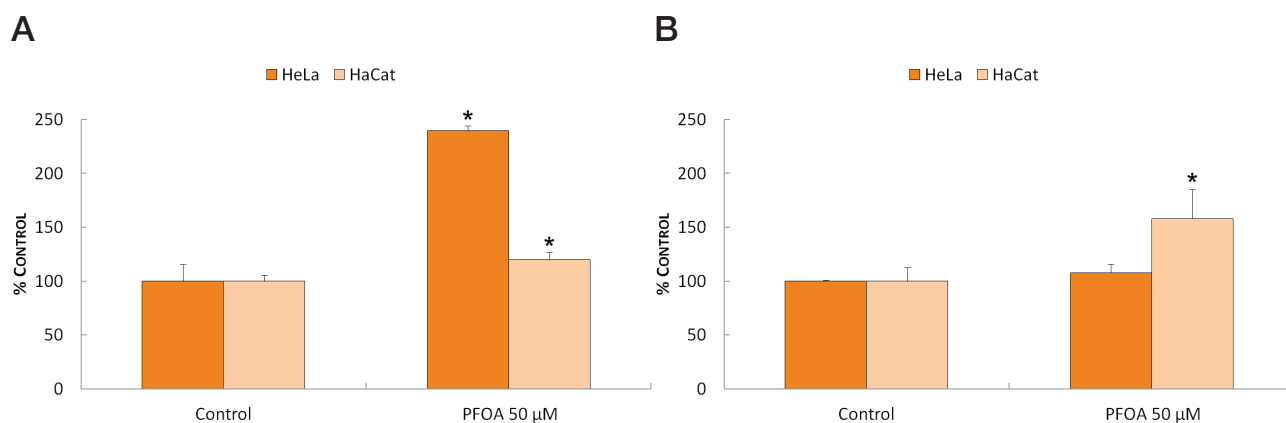
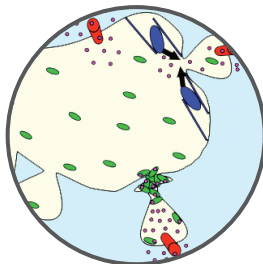
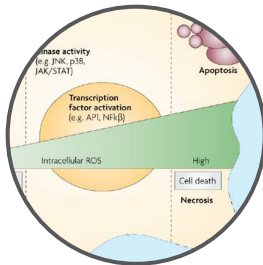
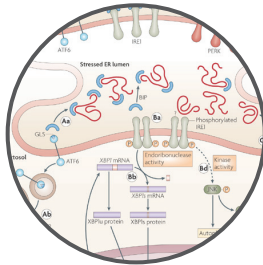


FIGURA 32. Detección del daño oxidativo al ADN mediante el marcaje inmunocitoquímico de 8-OHdG en células HeLa y HaCaT tratadas con PFOA 50 μM. Se representa el porcentaje con respecto al control ($M \pm SD$) del índice de 8-OHdG después de tratamientos de 24h (A) y 24h más 8 días en medio de cultivo libre del compuesto (B). * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$).

3.4. RESUMEN DE LOS EFECTOS DEL PFOA

- El PFOA ejerce efectos citotóxicos moderados dependientes de dosis, pero no de tiempo, en las líneas celulares HeLa y HaCaT, observándose alteraciones similares en las células tratadas durante 24h, 24+48h y 72h. La similitud entre los efectos detectados tras 24h y 24+48h implica que los daños producidos por el compuesto no son reversibles en nuestras condiciones experimentales.
- Los distintos tratamientos con PFOA producen alteraciones morfológicas en las dos líneas celulares analizadas, observándose fenómenos de tumefacción turbia y retracción celular. Las células HeLa muestran además alteraciones muy evidentes de su membrana plasmática en forma de ampollas o *blebs*. Estos efectos no son reversibles a pesar de la retirada del compuesto del medio de cultivo.
- El análisis de células HeLa tratadas con PFOA demuestra que, a pesar de la evidente presencia de *blebs*, estas células son viables y negativas a caspasa 3 activa. Como característica diferencial muestran un incremento de la señal de anexina A1, que se localiza preferentemente en el citoplasma y alrededor de los *blebs*.
- El compuesto tiene un claro efecto sobre el IM de las dos líneas celulares, observándose incrementos de IM como consecuencia de un retraso en la fase M del ciclo celular en los tratamientos con PFOA 50 μ M y disminuciones de la tasa de división celular a partir de 100 μ M en todas las condiciones analizadas. No se observa efecto alguno sobre el citoesqueleto de microtúbulos.
- La detección de bases oxidadas de ADN en células tratadas con PFOA demuestra la inducción de procesos de estrés oxidativo después de 24h de exposición al compuesto. Este efecto es reversible en las células HeLa, tras 8 días en medio de cultivo libre del compuesto, y persistente en la línea celular HaCaT, que en estas condiciones experimentales presenta además una parada de ciclo en la fase G0/G1 y marcaje positivo a β -galactosidasa.

DISCUSIÓN



A pesar de su alto grado de organización estructural y funcional, los organismos multicelulares reaccionan ante los cambios ambientales principalmente a nivel celular. Dependiendo de la severidad y la duración del estrés pueden distinguirse diferentes respuestas celulares que incluyen mecanismos de reparación, procesos adaptativos y activación de vías de apoptosis. De manera general, las respuestas celulares al estrés están mediadas a través de la inducción de chaperonas moleculares (Buchberger *et al.*, 2010), la eliminación de macromoléculas dañadas (Kroemer *et al.*, 2010) y los cambios en los patrones de expresión génica (Spriggs *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque las respuestas celulares ante situaciones de estrés son un mecanismo universal de extraordinaria importancia fisiológica y patológica, no todos los tipos de células presentan la misma capacidad de resistencia y defensa frente a los estímulos nocivos.

La evaluación *in vitro* de las respuestas celulares asociadas a la exposición a productos tóxicos requiere por lo tanto un minucioso diseño experimental que incluya la utilización de diferentes líneas celulares, la estricta elección de los tiempos de exposición y la selección de los parámetros de ensayo más adecuados para definir el perfil toxicológico del compuesto objeto de estudio. En base a estas premisas, se desarrolló la presente tesis doctoral que presenta nuevos y relevantes datos acerca de la toxicidad de tres compuestos químicos que han despertado una creciente preocupación en la comunidad científica y la sociedad en general.

El primero de los contaminantes emergentes evaluados en este trabajo fue el DEHP, utilizando un protocolo experimental de citotoxicidad basal en las líneas celulares Vero y HaCaT. Este tipo de estudios son una pieza fundamental en cualquier batería de ensayos toxicológicos al permitir establecer el perfil de los compuestos químicos, incluyendo los efectos de dependencia de dosis, y predecir la toxicidad sistémica aguda *in vivo* (Eisenbrand *et al.*, 2002). Para llevar a cabo el análisis se utilizó un enfoque multiparamétrico, basado en pruebas cuantitativas y cualitativas, que permitiera controlar el estado de las principales dianas de toxicidad subcelulares y proporcionar nuevos datos sobre el mecanismo de acción del DEHP en células de mamífero. Es importante indicar que, aunque las concentraciones seleccionadas para el estudio (1-100 μM) son mayores que las que se detectan en la población humana general, resultan clínicamente relevantes al encontrarse en el rango de las cuantificadas en el plasma de pacientes sometidos a procedimientos clínicos (FDA, 2002; Gillum *et al.*, 2009).

La valoración inicial de la citotoxicidad basal causada por la exposición al DEHP durante 24 horas, utilizando biomarcadores de viabilidad y crecimiento de los cultivos, reveló que todos los parámetros exhibían un claro efecto dependiente de concentración. Es conveniente resaltar que las curvas dosis-respuesta de las células Vero y HaCaT mostraron tendencias muy similares. Resultó especialmente sensible el ensayo de captación de rojo neutro (RN), que evidenció un claro descenso de viabilidad a partir de 10 μM en las dos líneas celulares, con

valores respecto al control muy inferiores a los obtenidos mediante la cuantificación de proteína celular total (CPT). Por su parte, los datos del ensayo del MTT resultaron semejantes a los obtenidos con el método de Bradford, lo que evidencia un descenso en el número de células del cultivo como consecuencia de los tratamientos. Los resultados del ensayo de RN mostraron un claro paralelismo con las observaciones microscópicas del compartimento endosomal marcado con NA, que ponían de manifiesto una alcalinización de los endosomas y/o lisosomas, especialmente evidente después de los tratamientos con DEHP 100 μ M. Por otra parte, la detección de mitocondrias con Ro123 puso de manifiesto una ligera fragmentación y tumefacción, reconocidas alteraciones reversibles provocadas por la exposición a compuestos que interfieren con la cadena de transporte de electrones y que generan problemas bioenergéticos (Gilkerson *et al.*, 2000; Lyamzaev *et al.*, 2004). Estos cambios en el retículo mitocondrial no resultaron sorprendentes, ya que existen evidencias que indican que el DEHP puede inducir disfunción mitocondrial tanto *in vitro* (Kora *et al.*, 1988; Zhou y Wallace, 1999) como *in vivo* (Satake *et al.*, 2010).

En resumen, nuestros primeros resultados demuestran que el tratamiento de las células Vero y HaCaT con concentraciones crecientes de DEHP durante 24 horas causa una desestabilización lisosomal y la consiguiente pérdida de la viabilidad celular. Estos datos concuerdan con los publicados previamente por nuestro grupo (Peropadre *et al.*, 2013) y otros autores en diferentes sistemas experimentales tales como macrófagos alveolares y lisosomas de células hepáticas de roedores (Bally *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 2001) y células del aparato digestivo de moluscos bivalvos (Marigómez y Baybay-Villacorta, 2003). Aunque no se conoce de momento el mecanismo molecular responsable, la capacidad del DEHP de incrementar el contenido en dolicol de las membranas lisosomales y como consecuencia su permeabilidad (Edlund *et al.*, 1986) podría estar relacionada con este efecto tóxico.

D

El análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo proporcionó pruebas concluyentes de que la disminución del número de células detectada con el ensayo de CPT tras los tratamientos con DEHP era debida a un retraso del ciclo celular en la fase G0/G1. Es importante señalar que no se observaron diferencias notables entre las líneas celulares Vero y HaCaT, lo que indica que este efecto es dependiente de dosis pero no específico del tipo celular. La atenuación de la progresión del ciclo celular representa un evento inicial común durante la respuesta adaptativa en células de mamífero, que tiene como objetivo reparar o minimizar el daño a nivel subcelular o molecular y restaurar la homeostasis celular. La maquinaria de ciclo celular en eucariotas está coordinada principalmente por las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). La regulación de la transición G1-S depende inicialmente de la asociación de ciclinas de tipo D (D1, D2, y/o D3) con Cdk4/6, y más tarde de los complejos de ciclina E-Cdk2 (Sherr y Roberts, 2004). Curiosamente, se ha descrito que el DEHP es capaz de disminuir los niveles de ciclina D1 y D2 y de Cdk4, así como de ciclina E y Cdk2 en diferentes modelos

experimentales (Li *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2010; Bhat *et al.*, 2013), aunque los mecanismos subyacentes todavía no han sido completamente esclarecidos.

En una serie posterior de experimentos decidimos examinar la posibilidad de que el DEHP pudiese interferir con la fisiología de retículo endoplásmico (RE). El RE es un compartimento celular formado por una red tridimensional de túbulos membranosos y cisternas aplanadas que participa en gran variedad de funciones celulares, como la síntesis de proteínas y fosfolípidos, la degradación de glucógeno y el mantenimiento de la homeostasis del calcio intracelular (Cribb *et al.*, 2005; Fagone y Jackowski, 2009; Braakman y Bulleid, 2011). *El RE es muy sensible a perturbaciones de su entorno. Así, los inhibidores de la glicosilación, algunas sustancias tóxicas, el estrés oxidativo o la acumulación de proteínas mal plegadas pueden alterar su función*, dando lugar a lo que se conoce como estrés de RE. En células de mamífero, tres proteínas transmembrana del RE (IRE1, *inositol requiring protein-1*; PERK, *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*; y ATF6, *activating transcription factor 6*) actúan como sensores del estrés de RE (Schröder y Kaufman, 2005). Cada uno de ellos presenta un dominio luminal, un dominio transmembrana y un dominio citosólico funcional. En células en reposo el dominio luminal está asociado con la chaperona GRP78/BiP (*glucose-regulated protein of 78 kDa/inmunoglobulin heavy chain-binding protein*), de forma que IRE1, PERK y ATF6 se mantienen inactivas. En situaciones de sobrecarga de proteínas mal plegadas GRP78/BiP se disocia de estos receptores, lo que provoca la activación de los mismos. En este sentido, GRP78 está considerada como un marcador temprano de estrés de RE (Lee, 2005; Pfaffenbach y Lee, 2011).

IRE1 fue el primer componente identificado de la vía de señalización de estrés de RE y es el más conservado evolutivamente (Cox *et al.*, 1993). Una vez activado, IRE1 se dimeriza y autofosforila, lo que conduce a la activación de su dominio ARNasa citoplasmático. Gracias a la actividad endonucleasa de este dominio, IRE1 realiza el *splicing* del factor de transcripción XBP1 (*x-box binding protein 1*), cuya forma activa se transloca al núcleo, donde regula positivamente la transcripción de genes implicados en el plegamiento de proteínas (Yoshida *et al.*, 2001). Una segunda vía de señalización de estrés de RE es iniciada por la activación de la quinasa PERK que, de manera muy similar a IRE1 y en situaciones de estrés de RE, se autofosforila y oligomeriza para activar su dominio citoplasmático. PERK en su forma activa fosforila el factor de iniciación de la traducción elf2α (*eukaryotic translation initiation factor 2α*), lo que conduce a la inhibición generalizada de la traducción, reduciendo así la carga de proteínas en el lumen del RE (Ma *et al.*, 2002). Además, la fosforilación de PERK y elf2α favorece la transcripción de factores de transcripción que, en situaciones de estrés de RE grave, regulan positivamente la expresión del factor pro-aptóico CHOP/GADD153 (*C/EBP-homologous protein/growth arrest and DNA damage 153*) (Oyadomari y Mori, 2004). La tercera vía involucra a la proteína transmembrana ATF6. Bajo condiciones de estrés de RE, ATF6 activado se transloca desde el RE al complejo de Golgi, donde se escinde por acción

de las proteasas S1P y S2P (Haze *et al.*, 1999). Este procesamiento tiene como consecuencia la liberación al citoplasma del dominio citosólico de ATF6, que se transloca al núcleo, donde favorece la expresión de chaperonas residentes del RE (Haze *et al.*, 1999) y genes relacionados con el sistema de degradación de proteínas asociado al RE (ERAD, *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) (Okada *et al.*, 2002).

La activación coordinada de las vías de IRE1, PERK y ATF6 constituye una respuesta específica al estrés de RE, denominada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*) (Bertolotti *et al.*, 2000), que tiene por objeto promover la supervivencia celular a través de la regulación positiva de chaperonas moleculares implicadas en el plegamiento de proteínas y la atenuación global de la síntesis proteica (Schröder, 2008; Kimata y Kohno, 2011; Walter y Ron, 2011). En situaciones de estrés de RE grave o prolongado, la vía de UPR puede finalmente promover la muerte celular mediante la activación de las vías de apoptosis (Tabas y Ron, 2011; Gorman *et al.*, 2012).

Para evaluar la posible inducción de una respuesta de estrés de RE por exposición a DEHP, se examinó en primer lugar la expresión de la chaperona molecular GRP78/BiP mediante la técnica de western blot. Los niveles de esta proteína se incrementaron en más de 2 veces en las dos líneas celulares ensayadas, lo que sugiere que el compuesto puede activar de manera eficiente la UPR en nuestras condiciones experimentales. Se evaluaron a continuación otros dos marcadores representativos de la respuesta de estrés de RE muy importantes en el control de la homeostasis celular, el factor de transcripción pro-apoptótico CHOP/GADD153 y la proteína Bcl-2 anti-apoptótica. Tanto GRP78 como CHOP y Bcl-2 exhibieron patrones diferentes de expresión temporal en las células Vero y HaCaT, mostrando así cinéticas distintas en la inducción de la vía de UPR. Estas diferencias específicas de tipo celular coinciden con estudios previos que demuestran que la capacidad para hacer frente al estrés de RE varía entre líneas celulares (Murray *et al.*, 2004; Rutkowski y Hegde, 2010). En el caso de las células Vero, la activación de la UPR produjo la sobreexpresión persistente de GRP78, característica clave de una respuesta de tipo adaptativo a un estrés de RE crónico leve, que se traduce en la supervivencia del cultivo (Rutkowski *et al.*, 2006). Además se observó que, mientras que los niveles de CHOP se mantuvieron estables e incluso se redujeron tras 24 horas de exposición a DEHP, la expresión de Bcl-2 se indujo claramente en las mismas condiciones experimentales. Tomados en conjunto, estos datos son consistentes con la idea de que el aumento de los niveles de la proteína GRP78 atenúan la inducción de CHOP (Oyadomari y Mori, 2004) y que la sobreexpresión de Bcl-2 previene la apoptosis mediada por RE (McCullough *et al.*, 2001). En línea con nuestros resultados, otros autores han relacionado la inhibición de procesos apoptóticos causada por DEHP en células embrionarias de hámster sirio (SHE) (Maire *et al.*, 2005; Landkocz *et al.*, 2011) y células MCF7 de cáncer de mama humano (Kim *et al.*, 2004) con el aumento de los niveles de Bcl-2.

Es importante señalar que los análisis realizados en paralelo mediante MET de células Vero tratadas durante 24 horas con DEHP revelaron características morfológicas compatibles con procesos de autofagia. Diversos estudios señalan que el estrés de RE puede desencadenar autofagia como una vía alternativa para degradar las proteínas defectuosas y para proteger contra la muerte celular (Ogata *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007; Høyer-Hansen y Jäättelä, 2007; Kroemer *et al.*, 2010). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que mecanismos adicionales al aumento de los niveles de Bcl-2, tales como la disminución de los niveles de CHOP y la autofagia reparativa, podrían explicar los efectos anti-apoptóticos del DEHP, al menos en algunos tipos celulares sometidos a estrés de RE.

En contraste con las células Vero, los tres marcadores de estrés de RE seleccionados se sobreexpresaron de forma simultánea y temprana en las células HaCaT para posteriormente desactivarse, observándose una disminución de los niveles tanto de GRP78 como de CHOP y Bcl-2 a las 24 horas de tratamiento con DEHP. Además, en este tipo celular se detectó mediante citometría de flujo un ligero incremento en la fracción sub-G1 apoptótica, aunque la mayoría de las células HaCaT sobrevivieron a los tratamientos de 24 horas con DEHP. Estos hallazgos son compatibles con una inducción transitoria de la UPR, en la que los niveles de CHOP fueron insuficientes para desencadenar la apoptosis masiva, probablemente debido a la sobreexpresión concomitante de GRP78 y Bcl-2. Esta circunstancia podría estar previniendo o retrasando la muerte celular en favor de la vía adaptativa. En línea con esta hipótesis, se ha descrito de que el destino celular no sólo depende de la gravedad o la duración del estrés de RE, sino también del equilibrio entre los factores pro-muerte y pro-supervivencia (Zhang y Kaufman, 2004; Rutkowski *et al.*, 2006). Cabe señalar también que no se detectaron indicios de autofagia mediante MET en células HaCaT después de 24 horas de exposición a DEHP. Estos resultados sugieren que podría existir una relación causal entre la duración de la UPR y la inducción de autofagia citoprotectora, lo que podría implicar que las diferentes cinéticas de expresión de GRP78 en células Vero y HaCaT pueden ser la base de los resultados discrepantes entre las dos líneas celulares. De hecho, se ha descrito el papel de esta chaperona en la inducción de autofagia en células de mamífero como parte de los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis del RE (Li *et al.*, 2008).

Otro hallazgo reseñable de este estudio fue la aparición de inclusiones lipídicas (CLDs, *Cytosolic Lipid Droplets*) en el citoplasma de las células tratadas con DEHP. La acumulación de CLDs se ha vinculado con situaciones de estrés celular asociado a condiciones patológicas como la obesidad y otras enfermedades metabólicas relacionadas (Walther y Farese, 2012). En consonancia con nuestros resultados, un buen número de estudios han demostrado recientemente que el estrés de RE estimula la formación de gotas de lípidos en células de mamífero (Lee *et al.*, 2012; Zhang y Zhang, 2012; Sturley y Hussain, 2012). Asimismo, existen pruebas convincentes de que los CLDs están presentes en las células para secuestrar pro-

teínas mal plegadas en etapas tempranas de estrés de RE (Welte, 2007; Hapala *et al.*, 2011), siendo considerados como mediadores clave en la ERAD (Klemm *et al.*, 2011; Jo *et al.*, 2013).

También es importante mencionar que, en nuestras condiciones experimentales, las células epiteliales de riñón Vero presentaron un aumento de los depósitos de glucógeno como resultado de la exposición a DEHP. Las inclusiones de glucógeno en el citoplasma de estas células podrían ser consecuencia, bien de la inhibición de la glucólisis, o bien del incremento en la cantidad de glucosa-6-fosfato citosólica. Estas hipótesis se basan en observaciones previas de otros autores, que indican que el compuesto es capaz de interferir con la ruta glucolítica (Gerbracht *et al.*, 1990; Rengarajan *et al.*, 2007) y reducir la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (Mushtaq *et al.*, 1980; Mann *et al.*, 1985), una enzima presente sólo en hígado y riñón e implicada en la glucogenolisis. Por lo tanto, las células se encontrarían en una situación en la que no pudiendo degradar la glucosa de forma eficaz, la almacenarían en forma de glucógeno, cuyo catabolismo tampoco podría ser llevado a cabo con normalidad. Curiosamente, y aunque se debe ser muy precavido al extrapolar observaciones *in vitro* a la situación *in vivo*, nuestros resultados son muy similares a algunos observados previamente en estudios con animales. Existen datos que indican que la acumulación de gránulos de glucógeno (la denominada lesión de Armanni-Ebstein) es la alteración más frecuente en las células epiteliales de los túbulos renales de ratas con diabetes inducida experimentalmente (Kang *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2013), aunque la importancia patológica de esta observación sigue siendo poco clara.

Es oportuno mencionar en este punto que diversos estudios epidemiológicos y experimentales han documentado que la exposición constante a DEHP puede tener efectos sobre la homeostasis metabólica, aumentando el riesgo de padecer obesidad y diabetes tipo 2 (Hatch *et al.*, 2010; Svensson *et al.*, 2011; Tang-Péronard *et al.*, 2011). Aunque no se dispone todavía de datos concluyentes, existen evidencias de que la interacción con receptores nucleares activados por ligando (NRs, *Nuclear Receptors*) puede ser crítica en el inicio y/o tratamiento de estos trastornos metabólicos relacionados entre sí (Reinehr, 2010; Mauvais-Jarvis, 2011; Burris *et al.*, 2012). La activación por DEHP y sus metabolitos de varios miembros de la familia de los NRs, especialmente los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), así como sus consecuencias metabólicas ha sido estudiada en profundidad (Desvergne *et al.*, 2009; Feige *et al.*, 2010). Sin embargo, dada la conocida interferencia entre factores de transcripción, coreguladores y vías de señalización implicadas en el control de la homeostasis energética (Feige y Auwerx, 2007), es necesario continuar con las investigaciones para definir con exactitud la etiología de las enfermedades metabólicas. En este sentido, recientes estudios consideran que la inducción de la UPR podría ser un factor clave en la patogénesis de enfermedades metabólicas y otros trastornos humanos relacionados (Sha *et al.*, 2011; Back y Kaufman, 2012; Ozcan y Tabas, 2012; Samuel y Shulman, 2012). Esta posibilidad pone de manifiesto la especial relevancia de nuestros

resultados, ya que demuestran por primera vez que el DEHP induce una respuesta de estrés de RE en células de mamífero.

El estrés de RE producido como consecuencia del mal plegamiento de proteínas puede ser inducido por diferentes estímulos, tales como alteraciones en la homeostasis redox, la privación de nutrientes o el fallo de ciertas modificaciones post-traduccionales (Høyer-Hansen y Jäättelä, 2007). Aunque no era un objetivo de este estudio determinar el mecanismo inductor de la disfunción del RE, la capacidad del compuesto de reducir los niveles de dolicol fosfato y, como consecuencia, las tasas de glicosilación de las proteínas (Ganning *et al.*, 1987) podría explicar en parte nuestros resultados. Esto sugiere que el DEHP compartiría un mecanismo de acción común con la tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación considerado como uno de los más potentes inductores de la UPR (Bull y Thiede, 2012). Independientemente del mecanismo subyacente a la inducción del estrés de RE, nuestros resultados indican que el DEHP provoca una respuesta protectora de la UPR tanto en células Vero como HaCaT. En este sentido es importante destacar que la activación de la UPR protege contra posibles daños tóxicos posteriores, tanto en células epiteliales de origen renal (Hung *et al.*, 2003; Bedard *et al.*, 2004; Peyrou y Cribb, 2007) como en células HaCaT (Mera *et al.*, 2010). Además, se ha propuesto que el acondicionamiento previo por estrés de RE puede conferir resistencia a algunos agentes farmacéuticos (Zhang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011). Esta observación es de particular preocupación teniendo en cuenta que los pacientes sometidos a quimioterapia están expuestos a través de los dispositivos médicos de PVC a niveles de DEHP que exceden el valor de ingesta tolerable de 0,6 mg/kg/día (Tickner *et al.*, 2001; McKee *et al.*, 2004).

D

El compuesto analizado en segundo lugar fue el TCS, seleccionando las líneas celulares humanas HaCaT, MDA-MB-231 y MCF7, en base a la absorción cutánea del compuesto en humanos (Queckenberg *et al.*, 2010) y a las crecientes sospechas acerca de su posible implicación en el desarrollo de cáncer de mama (Darbre y Charles, 2010; Dinwiddie *et al.*, 2014). La aproximación metodológica incluyó en una primera etapa la valoración de la citotoxicidad basal en las tres líneas celulares, después de un tratamiento de 24 horas con un rango creciente de concentraciones del compuesto. A continuación, considerando que el TCS es un bactericida presente en una amplia gama de PPCPs de uso diario, se diseñó un nuevo protocolo experimental consistente en la utilización de concentraciones subcitotóxicas del compuesto durante un tiempo de exposición más prolongado (120 horas).

Los resultados de las pruebas cuantitativas de citotoxicidad basal, que incluían tanto parámetros de viabilidad como de crecimiento del cultivo, mostraron un claro efecto dependiente de concentración en las tres líneas celulares estudiadas. Los datos de los ensayos de RN y MTT presentaron una correlación significativa con los obtenidos mediante la cuantificación de proteína celular total, lo que sugiere que los tratamientos con TCS durante 24 horas causaban una disminución del número de células en los cultivos. Los menores valores de EC50 se obtuvieron con el ensayo de captación de RN, señalando a la membrana plasmática y/o la del compartimento endosomal como dianas preferentes del compuesto. Coincidiendo con nuestros resultados, otros autores llegaron a estas mismas conclusiones utilizando células gingivales humanas S-G (Zuckerbraun, 1998), células de carcinoma humano KB, células Vero y células BHK-21 de riñón de mono y hámster respectivamente (Jirasripongpun *et al.*, 2008), así como hemocitos de los bivalvos marinos *Mytilus galloprovincialis* y *Haliotis tuberculata* (Canesi *et al.*, 2007; Gaume *et al.*, 2012). Estos datos no resultan sorprendentes si tenemos en cuenta que estudios realizados con modelos artificiales de membrana han demostrado que el TCS puede perturbar las funciones del plasmalema de las células eucarióticas (Lygre *et al.*, 2003), debido a su fácil interacción con los fosfolípidos de la bicapa (Guillén *et al.*, 2004).

Numerosas pruebas experimentales y epidemiológicas demuestran que un mismo compuesto puede inducir efectos tóxicos agudos, pero también subcrónicos y crónicos dependiendo de la dosis y del tiempo de exposición. Tal es el caso del TCS, para el que se dispone de un importante número de datos a este respecto derivados de experimentos en animales de laboratorio (Rodricks *et al.*, 2010; Witorsch y Thomas, 2010). Los estudios de toxicidad a largo plazo o de dosis repetida definidos por las autoridades reguladoras que se realizan en modelos animales presentan serias deficiencias debidas a diferencias inter-especie, lo que dificulta la predicción de la toxicidad para los seres humanos (Worth y Balls, 2002). En este sentido, los ensayos *in vitro* pueden proporcionar información más relevante para la evaluación del riesgo a medio y largo plazo de los productos químicos que los ensayos con animales de experimentación, aunque también manifiestan importantes limitaciones desde el punto de vista de la regulación (Hartung y Daston, 2009). Es conveniente mencionar que el programa MEIC (*Multicenter Evaluation of In Vitro Cytotoxicity*) presentó pruebas concluyentes de que los ensayos desarrollados para evaluar la toxicidad aguda (24 horas) de un compuesto también pueden ser utilizados para detectar efectos a más a largo plazo (Dierickx y Ekwall, 1992; Ekwall *et al.*, 1999). Sobre esta base se han publicado algunos interesantes estudios que, utilizando células humanas en cultivo, han ofrecido resultados bastante prometedores (Scheers *et al.*, 2001; Fabre *et al.*, 2003; Ullrich *et al.*, 2009). Sin embargo, en la actualidad no existen modelos *in vitro* aceptados capaces de reemplazar a las pruebas de toxicidad de dosis repetida que se llevan a cabo *in vivo*, a pesar de que los esfuerzos realizados al respecto han sido considerables (Pfaller *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2006; Adler *et al.*, 2011; Basketter *et al.*, 2012).

En el marco descrito anteriormente, la segunda parte de nuestro estudio se centró en detectar posibles alteraciones ocasionadas en las células HaCaT, MDA y MCF7 por una exposición prolongada a bajas concentraciones de TCS. Se utilizó en este caso un rango de concentraciones (0-2 μM) comparable a los niveles medios de dosis del compuesto a los que se somete diariamente la población humana (Dann y Hontela, 2011). Se determinó en primer lugar el contenido en proteína celular total (CPT), un parámetro de gran utilidad para evaluar *in vitro* la toxicidad a largo plazo de productos químicos (Scheers *et al.*, 2001). Nuestros resultados evidenciaron un incremento significativo del CPT en los pocillos que contenían células expuestas 120 horas a TCS 0.5 μM (HaCaT) y 1 μM (MDA y MCF7) con respecto al control. El resto de los tratamientos no causaron diferencias significativas, observándose tan sólo una leve disminución del contenido en proteína después de la exposición a la mayor de las concentraciones ensayadas (2 μM).

Se llevó a cabo a continuación un análisis de los perfiles de ciclo celular mediante citometría de flujo, con el fin de precisar el significado de estos resultados iniciales. Los tratamientos con TCS 0.5/1 μM ocasionaron un aumento significativo del porcentaje de células en la fase G2/M, así como del número de células poliploides en las tres líneas celulares utilizadas. Resulta de especial interés destacar que estos cambios fueron exclusivos de los tratamientos prolongados con dichas concentraciones. Así, al comparar los resultados con los obtenidos después de exponer los cultivos durante 24 horas a las mismas concentraciones del compuesto, se obtuvieron perfiles de ciclo distintos. En este caso, observamos que las células HaCaT y MDA mostraban un leve retraso en la fase G0/G1 acompañada de una reducción del periodo S, sin cambios en la fase G2/M, mientras que las células MCF7 exhibían una leve disminución de la fase G0/G1 como único cambio evidente. También es importante hacer notar que los tratamientos con TCS 10 μM dieron lugar a variaciones en las distintas fases del ciclo compatibles con una inhibición de la proliferación celular, así como a un aumento del porcentaje de células en la fracción sub-G1 apoptótica en todas las líneas celulares analizadas, aunque de forma más moderada en las células MCF7. Esta situación no es de extrañar si tenemos en cuenta que esta línea celular carece de actividad caspasa 3 (Essmann *et al.*, 2004), un importante efector en la muerte celular por apoptosis. Coincidiendo con nuestros resultados, otros autores han descrito previamente que el TCS es capaz de activar vías apoptóticas en distintos modelos celulares tanto tumorales (Lupu y Menendez, 2006; Deepa *et al.*, 2012; Honkisz *et al.*, 2012; Vandhana *et al.*, 2013) como no tumorales (Zuckerbraun *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 2012). Finalmente, consideramos destacable el hecho de que las células expuestas durante 120 horas a TCS 2 μM mostraron perfiles de ciclo muy similares a los observados después de un tratamiento de 24 horas con TCS 10 μM . Esta circunstancia parece evidenciar que, al menos en nuestras condiciones experimentales, una exposición de 5 días a estas dosis del compuesto podría tener el mismo efecto sobre la proliferación celular que una exposición aguda (24 horas) a una concentración 5 veces superior.

Nuestro estudio prosiguió llevando a cabo pruebas complementarias, con el objeto de profundizar en las alteraciones producidas por la interferencia del TCS con la normal progresión del ciclo celular. En primer lugar se realizaron recuentos de índice mitótico que revelaron que una exposición aguda a concentraciones altas del compuesto causaba un efecto antiproliferativo, como ya sugerían nuestros datos previos de citotoxicidad basal. Estos resultados concuerdan con los publicados por otros autores utilizando como modelo células humanas de coriocarcinoma JEG-3 (Honkisz *et al.*, 2012), así como células madre mesenquimales (Guo *et al.*, 2012), lo que indica que puede tratarse de un efecto independiente del tipo celular. Por otra parte, las exposiciones prolongadas a TCS 0.5 μ M (HaCaT) y 1 μ M (MDA y MCF7) resultaron en un aumento significativo tanto del número de células como del índice mitótico de los cultivos, lo que explicaría los incrementos en el contenido de proteína celular total y el porcentaje de células en G2/M previamente descritos. Asimismo, pudimos comprobar que los tratamientos con la mayor concentración analizada (2 μ M) producían una disminución de la actividad mitótica respecto al control, estadísticamente significativa en el caso de las células HaCaT. Es importante mencionar que en los últimos años ha habido un gran interés por las relaciones dosis-respuesta bifásicas cuando se analiza la toxicidad de los compuestos químicos. Estas respuestas, que implican una estimulación a bajas dosis y una inhibición a dosis superiores (Calabrese y Baldwin, 1997), parecen ser más comunes que las reflejadas en curvas lineales sin umbral o lineales con umbral (Calabrese y Baldwin, 2003). Conocer la forma de las curvas dosis-respuesta para diferentes parámetros resulta fundamental para definir los mecanismos subyacentes a los efectos tóxicos, así como para evaluar los riesgos potenciales para la salud ambiental y humana (Calabrese, 2005).

D Una cuestión importante a tener en cuenta es que existen evidencias previas del efecto mitógeno del TCS cuando se someten las células MCF7 a una concentración 1 μ M del compuesto durante largos periodos de tiempo (Gee *et al.*, 2008; Henry y Fair, 2013). Sin embargo, hay que mencionar que los datos de estos autores proceden del ensayo *E-screen*, dirigido a definir el carácter estrogénico del compuesto y su capacidad como agonista del estradiol. Teniendo en cuenta que nuestras condiciones experimentales no son comparables, así como la coincidencia de resultados en las tres líneas celulares analizadas, consideramos que no resulta posible establecer un paralelismo entre nuestras observaciones y las del citado estudio. Por lo tanto, nuestro interés se centró en tratar de identificar el mecanismo subyacente a las evidentes alteraciones de la proliferación celular causadas por el TCS en nuestro sistema experimental.

La inducción de estrés oxidativo, asociada a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y la capacidad de defensa antioxidante de las células (Halliwell, 2008), fue el primer potencial mecanismo que evaluamos en la siguiente etapa de nuestra investigación. La presencia intracelular de ROS es consecuencia

directa de la actividad de la cadena respiratoria, a través de los distintos complejos situados en la membrana mitocondrial interna (Andreyev *et al.*, 2005; Murphy, 2009). Es de sobra conocido que los incrementos intracelulares en los niveles de ROS afectan a la fisiología celular debido a la gran reactividad de dichos radicales con biomoléculas esenciales tales como lípidos, proteínas y ADN (Valko *et al.*, 2006). De hecho, las principales consecuencias de este daño oxidativo constituyen la base de diversas patologías humanas como diabetes, cáncer, aterosclerosis y ciertas enfermedades neurodegenerativas (Favier, 2006; Giustarini *et al.*, 2009). Sin embargo, actualmente también está bien documentado el papel fundamental que ejercen las ROS como segundos mensajeros en rutas de señalización, regulando numerosos procesos celulares, entre los que se incluye la proliferación (Sarsour *et al.*, 2009; Matés *et al.*, 2012).

La generación intracelular de ROS fue analizada en el presente estudio mediante la inmunodetección de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), que resulta de la adición de un radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) a la guanina en posición C8 (Cadet *et al.*, 1999). La presencia de 8-OHdG es considerada actualmente como un marcador muy sensible de estrés oxidativo y carcinogénesis, tanto *in vivo* como *in vitro* (Valavanidis *et al.*, 2009). Nuestros resultados mostraron que tanto las células tratadas durante 24 horas con TCS como las sometidas a una exposición de 120 horas presentaban signos de daño oxidativo, evidenciados como un incremento significativo en los índices de 8-OHdG. Es importante señalar que no se apreciaron diferencias notables entre las tres líneas celulares y que, para una misma concentración ($0.5/1 \mu\text{M}$), el efecto fue más moderado después de los tratamientos prolongados con el compuesto. A pesar de que se considera que la 8-OHdG es generada principalmente por los radicales $\cdot\text{OH}$, o directamente por reacciones fotodinámicas (Cooke *et al.*, 2003), no podemos descartar la posible participación de ciertos intermediarios reactivos del TCS. En particular la de los radicales fenoxilo ($\text{PhO}\cdot$) originados por oxidación de los compuestos fenólicos, que son capaces de reaccionar fácilmente con el C8 de la desoxiguanosina, generando 8-OHdG (Manderville, 2005). Además, los radicales $\text{PhO}\cdot$ pueden a su vez ser transformados por los antioxidantes celulares en anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), que por dismutación produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y eventualmente radicales $\cdot\text{OH}$ (Shvedova *et al.*, 2000; Galati *et al.*, 2002). Un reciente estudio que analiza las propiedades oxidantes del TCS en timocitos de rata demuestra que el compuesto se comporta de manera equivalente al H_2O_2 (Tamura *et al.*, 2012). Está bien establecido que las ROS, y en especial el H_2O_2 , pueden promover tanto paradas de ciclo y muerte celular subsiguiente, como incrementos en las tasas de proliferación de los cultivos, dependiendo de los niveles intracelulares, del tiempo de exposición y/o de las líneas celulares ensayadas (Boonstra y Post, 2004; Bartosz, 2009). Coincidiendo con estas observaciones, los resultados de este estudio demuestran que los incrementos significativos en los índices de 8-OHdG se encontraban estrechamente vinculados al bloqueo del ciclo celular y la inducción de apoptosis. Asimismo, la persistencia de bajos niveles de 8-OHdG después de exposiciones prolongadas a TCS evidencia muy probablemente una situación de estrés oxidativo leve, pero

sostenido en el tiempo, que sería responsable de los incrementos de la proliferación celular observados. Es esencial hacer mención en este punto a la coincidencia entre nuestros resultados y los presentados en un trabajo recientemente publicado, que demuestran una relación directa entre la exposición crónica a niveles moderados de H_2O_2 y los incrementos de viabilidad, proliferación y potencial tumorigénico de las células MCF7 (Mahalingaiah y Singh, 2014). Nuestros datos no sólo confirman, sino que además complementan en gran medida los anteriormente citados, al haberse observado efectos equivalentes en líneas celulares humanas tumorales y no tumorales. Está perfectamente documentado que las respuestas de adaptación celular al estrés oxidativo constituyen uno de los mecanismos de resistencia a determinados agentes quimioterapéuticos que basan su acción citotóxica en la generación de ROS (Pelicano *et al.*, 2004; Barrera, 2012). Sin embargo, las pruebas adicionales que aportamos podrían ayudar a explicar algunos efectos tóxicos colaterales que pueden aparecer en tejidos no tumorales durante los tratamientos con quimioterapia (Chen *et al.*, 2007).

Por otra parte, existen numerosas evidencias de que el estrés oxidativo es un importante iniciador y promotor de la carcinogénesis y contribuye a la progresión de tumores (Halliwell, 2007; Kryston *et al.*, 2011). A pesar de que sigue existiendo una gran controversia acerca de la posible participación del TCS en los procesos de tumorigénesis, la EPA lo clasifica como “probablemente no cancerígeno para los seres humanos” (EPA, 2008). Es importante recordar que los radicales libres y las ROS no sólo producen modificaciones de bases en el ADN, sino también roturas de cadena simple o de doble cadena, así como puentes cruzados ADN-proteína (Storr *et al.*, 2013). De entre las lesiones oxidativas, las más peligrosas son las roturas de doble cadena (DSBs, *double-strand breaks*), ya que son difíciles de reparar y pueden contribuir a la inestabilidad genómica, facilitando así el desarrollo de procesos tumorales (Khanna y Jackson, 2001; Altieri *et al.*, 2008). Aunque no se tienen evidencias de la potencial mutagenicidad del TCS según los ensayos estándar (Rodricks *et al.*, 2010), la inducción de daño genotóxico ha sido descrita en diversos modelos ecotoxicológicos, entre los que se incluyen el mejillón cebra *Dreissena polymorpha*, (Binelli *et al.*, 2009a, b), el alga *Closterium ehrenbergii* (Ciniglia *et al.*, 2005), el mosquito *Chironomus riparius* (Martínez-Paz *et al.*, 2013) y la planta superior *Allium cepa* (Herrero *et al.*, 2012). Sin embargo, los datos relativos a la genotoxicidad del compuesto en células de mamífero son muy escasos, a excepción de los obtenidos en las líneas celulares KB y Vero mediante el ensayo cometa (Jirasripongpun *et al.*, 2008). En dicho trabajo los autores demuestran que el TCS es capaz de inducir roturas de ADN después de la exposición durante 5 días a una concentración que aparece en algunos productos cosméticos (23 μ M).

Volviendo a nuestros resultados, se pudo observar por marcaje inmunofluorescente la presencia de focos nucleares de γ -H2AX en las mismas condiciones experimentales en las que detectamos importantes incrementos del índice 8-OHdG. La fosforilación de la histona H2AX en la serina 139 (γ -H2AX) es un reconocido marcador de DSBs en el ADN (Kuo y Yang, 1998),

ya que se requiere para el ensamblaje de las proteínas de reparación del ADN en los lugares de daño, así como para la activación de los puntos de control que detienen la progresión del ciclo celular (Podhorecka *et al.*, 2010). En el caso de las dobles roturas, la kinasa ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) actúa como sensor de daño y coordina una ruta de señalización específica mediante la fosforilación de sustratos como p53, Chk2, Chk1, Brca1 y H2AX (Shiloh y Ziv, 2013). Un aspecto destacable de nuestros datos fue la desaparición de la marca de DSBs en las células incubadas con 0.5/1 μ M de TCS durante 120 horas. Aunque existe cierta controversia, en general se reconoce que los focos nucleares de γ -H2AX desaparecen gradualmente a medida que progresa la reparación del ADN (Chowdhury *et al.*, 2005; Bonner *et al.*, 2008). En consecuencia, se podría especular que las DSBs causadas por el compuesto a través de la inducción de daño oxidativo al ADN durante las primeras 24 horas de tratamiento fueron reparadas de manera eficiente en las tres líneas celulares analizadas. Las células de mamífero disponen de dos estrategias principales para subsanar las DSBs, denominadas recombinación homóloga (HR) y reunión de extremos no homólogos (NHEJ) (Karagiannis y El-Osta, 2004; Cann y Hicks, 2007). Ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes, aunque la contribución relativa de cada uno de ellos depende de la fase del ciclo en el que se produce el daño (Sonoda *et al.*, 2006; Hartlerode y Scully, 2009).

La integración de los resultados obtenidos en esta fase del estudio nos permitió formular una serie inicial de deducciones. En primer lugar, el TCS manifiesta un comportamiento dual sobre las tasas de proliferación de las células humanas en cultivo, que depende tanto de la concentración utilizada como del tiempo de exposición. Por otra parte, nuestras observaciones demuestran que el estrés oxidativo es el mecanismo responsable de la citotoxicidad basal inducida por el TCS, tanto en células normales como tumorales. En este sentido, nuestros datos concuerdan con los obtenidos por otros autores en timocitos de rata (Tamura *et al.*, 2012), hemocitos de moluscos bivalvos (Gagné *et al.*, 2006; Binelli *et al.*, 2009a) y células de hepatoma humano HepG2 (Ma *et al.*, 2013). Otra cuestión destacable es la respuesta común de las tres líneas celulares ante las alteraciones en la homeostasis redox causadas por el compuesto objeto de nuestro estudio. Como hemos demostrado, los niveles altos de estrés oxidativo causaron efectos citotóxicos compatibles con una respuesta de daño al ADN. Esta respuesta celular que se activa por diversos factores, entre los que se incluye el daño oxidativo (Tanaka *et al.*, 2006), tiene por objeto proporcionar un tiempo adicional a las células para subsanar las lesiones y para activar procesos de muerte programada o de senescencia cuando la reparación no es posible (Rich *et al.*, 2000; Zhou y Elledge, 2000; Abraham, 2001; Rouse y Jackson, 2002). Por su parte, los cambios leves en el estado redox intracelular detectados a las 120 horas indujeron un claro efecto mitogénico, considerado como una respuesta adaptativa básica a la que recurren las células una vez que se ha completado la reparación para alcanzar un nuevo estado de equilibrio y preservar su viabilidad (Kumar *et al.*, 2009). Es importante recordar en este contexto que los incrementos de la actividad proliferativa fueron concomitantes con la

aparición de células poliploides en los cultivos. Existen bastantes evidencias que sugieren que las células poliploides resultantes de un daño genotóxico pueden albergar una mayor capacidad de reparación del ADN (Ivanov *et al.*, 2003) y, por lo tanto, proporcionar una vía alternativa de supervivencia celular (Cortés *et al.*, 2004; Davoli y de Lange, 2011). Estas afirmaciones podrían explicar nuestros resultados razonablemente, sin embargo, para confirmar esta hipótesis serían necesarios estudios adicionales que escapan a los objetivos de la presente tesis.

Para finalizar, además de indicar la valiosa contribución de nuestros datos al conocimiento de los efectos tóxicos causados *in vitro* por exposiciones prolongadas a TCS, planteamos nuestra siguiente propuesta de investigación basada en la toxicogenómica, para ayudar a completar el perfil toxicológico de este potente agente antibacteriano. A este respecto, es importante mencionar que la EPA y la FDA están trabajando en conjunto desde el año 2013 con el fin de recabar nueva información y revisar la ya existente acerca de los efectos tóxicos del TCS y la seguridad de los niveles de exposición en humanos, de cara a una posible nueva regulación (EPA, 2014). En el presente estudio, se ha realizado una aproximación al análisis de expresión génica mediante un microarray de ADNc tras la exposición de células HaCaT, MDA y MCF7 a TCS (0.5/1 μ M) durante 120 horas. Esta tecnología se considera actualmente una herramienta de gran utilidad en Toxicología para el análisis de los mecanismos de acción de compuestos químicos de interés (Lettieri, 2006; Gant, 2007; Gomase *et al.*, 2008). Es importante señalar que existen algunos análisis realizados con microarrays dirigidos a determinar cambios de expresión génica inducidos por TCS en distintos grupos de bacterias (Betts *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2008; Bailey *et al.*, 2009). Sin embargo, no existen datos equivalentes en células humanas, a excepción de un estudio realizado en leucocitos de sangre periférica de donantes sanos, en el que se definen las capacidades antiinflamatorias del compuesto (Barros *et al.*, 2010).

D

Los resultados de nuestro análisis de expresión génica son estrictamente preliminares, ya que requieren tareas complementarias, todavía en curso, como son la validación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y la determinación de los niveles de proteína de los genes de mayor interés mediante western blot. No obstante, decidimos incluirlos en el presente documento ya que, aun siendo meramente especulativos, aportan información de interés que debería ser tenida en cuenta en un futuro. Así por ejemplo, detectamos que ciertos genes implicados en el transporte y metabolismo de ácidos grasos y colesterol presentaban un perfil de expresión similar en las tres líneas celulares. Este hecho es de particular interés ya que se ha demostrado que el TCS inhibe el complejo multienzimático *ácido graso sintasa* (FAS, *Fatty Acid Synthase*), que cataliza la síntesis de ácidos grasos de cadena larga tanto en bacterias (Heath *et al.*, 2000) como en líneas celulares humanas de cáncer de mama (Liu *et al.*, 2002). Por su parte, algunos genes de interleuquinas y de isoformas de p450, así como otros relacionados con la progresión del ciclo celular, mostraron patrones de expresión diversos en

las tres líneas celulares, lo que no resulta extraño ya que es bien conocido que la respuesta transcripcional global al estrés en las células humanas es enormemente específica del tipo celular (Murray *et al.*, 2004).

La evaluación *in vitro* de los posibles efectos citotóxicos del PFOA, el tercero de los compuestos analizados, se llevó a cabo en las líneas celulares HeLa y HaCaT bajo distintas condiciones de exposición. A pesar de que el PFOA es metabólicamente inerte en mamíferos y, por lo tanto, un agente químico particularmente adecuado para los ensayos de toxicidad *in vitro*, no existen datos concluyentes en células humanas que determinen con precisión el mecanismo de acción de este compuesto. De manera general se considera que los efectos citotóxicos causados por los agentes químicos dependen principalmente de la concentración utilizada y del tiempo de exposición. Sin embargo, existen estudios que demuestran que el tiempo transcurrido entre el final del tratamiento y el ensayo de citotoxicidad puede ser un factor clave a la hora de analizar un compuesto (Komissarova *et al.*, 2005; McKim, 2010).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, así como el prolongado tiempo de retención del PFOA en los tejidos humanos (Kudo y Kawashima, 2003; Andersen *et al.*, 2006), decidimos diseñar un protocolo experimental en dos etapas. En una primera fase del estudio se analizaron tanto la toxicidad aguda por exposición continua al compuesto, como la posible reversibilidad de los daños citotóxicos y/o la aparición de alteraciones a medio plazo. En una segunda etapa, se evaluó la potencial inducción de cambios específicos a largo plazo una vez finalizada la exposición al compuesto, un fenómeno que se conoce como toxicidad retardada y que permite obtener datos con un alto valor predictivo para la toxicidad humana (Dierickx, 2003).

La evaluación de la citotoxicidad basal, utilizando tres ensayos complementarios entre sí que incluían marcadores de viabilidad y de crecimiento del cultivo, reveló que todos los parámetros analizados exhibían un claro efecto dependiente de dosis en las dos líneas celulares utilizadas. Por otra parte, el análisis estadístico de correlaciones puso de manifiesto que los resultados de citotoxicidad cuantificados tanto en las células HeLa como en las HaCaT no estaban relacionados con las distintas condiciones de exposición al PFOA. Como indican nuestros datos, los efectos citotóxicos causados por el compuesto durante las primeras 24 horas resultaron ser equivalentes no sólo a los detectados en los cultivos sometidos a un tratamiento continuo durante 72 horas, sino también a los obtenidos en la condición experimental de 24+48 horas. Estas observaciones parecen indicar que las alteraciones inducidas por el PFOA tienen lugar durante las primeras 24 horas de tratamiento y no son reversibles una vez retirado el compuesto del medio de cultivo. Es importante destacar también que las curvas dosis-respuesta

obtenidas para los distintos parámetros y condiciones experimentales presentaban perfiles muy similares. Esto indica que las pruebas cuantitativas realizadas en esta primera etapa de experimentación no estaban detectando una lesión citotóxica específica, sino más bien una disminución en el número de células de los cultivos como consecuencia de los diferentes tratamientos con PFOA.

Nuestros datos de citotoxicidad basal concuerdan con los publicados previamente por otros autores utilizando distintos tipos celulares, entre los que se incluyen hepatocitos primarios de peces (Liu *et al.*, 2007), células de hepatoma humano HepG2 (Shabalina *et al.*, 1999; Hu y Hu, 2009; Florentin *et al.*, 2011) y células renales de primate Vero (Fernández Freire *et al.*, 2008), que definen al PFOA como un agente discretamente tóxico para las células en cultivo. De particular importancia es el hecho de que los ensayos realizados en roedores también consideran que la exposición aguda al PFOA causa una toxicidad leve o moderada (Hekster *et al.*, 2003; Kudo y Kawashima, 2003). Esta analogía entre los datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* refuerza la idea cada vez más aceptada de que, para la mayoría de los productos químicos, existe una excelente correlación entre los datos de los ensayos de citotoxicidad basal y los de toxicidad aguda clásicos que utilizan animales de experimentación (ECVAM, 2002).

La interferencia del PFOA con la normal progresión de los cultivos de células HeLa y HaCaT nos llevó a realizar un análisis complementario con el fin de determinar un posible efecto citostático del compuesto. Se seleccionaron tres concentraciones representativas (50, 100 y 250 μM) para realizar recuentos de índice mitótico después de los diferentes tiempos de exposición. Los datos coincidieron con los que habíamos obtenido previamente en la línea celular Vero (Fernández Freire *et al.*, 2008), así como con los observados por otros autores utilizando células HepG2 (Shabalina *et al.*, 1999), que demuestran que el PFOA en concentraciones iguales o superiores a 100 μM causa un efecto antiproliferativo *in vitro*. Sin embargo, los tratamientos con la menor de las concentraciones analizadas (50 μM) dieron lugar a un aumento significativo en los valores de índice mitótico respecto al control en todas las condiciones experimentales, incluyendo aquella en la que las células crecieron durante 48 horas adicionales en medio libre de droga. Es conveniente destacar en este punto que, a pesar de que no existen suficientes evidencias epidemiológicas, la EPA clasifica al PFOA como “posible carcinógeno para humanos” (EPA, 2006). No obstante, el análisis pormenorizado de las células en las distintas fases de la mitosis descartó que el compuesto produjera un efecto mitogénico en nuestras condiciones experimentales, ya que los incrementos de índice mitótico se correspondían únicamente con un mayor porcentaje de células en profase y metafase respecto a los cultivos control. Las observaciones mediante microscopía de fluorescencia de las figuras mitóticas mostraron algunas metafases con cromosomas mal congregados, compatibles con un retardo en la transición metafase-anafase. Existen evidencias previas que indican que la exposición de células HepG2 a PFOA 50 μM durante 24 horas causa

una parada de ciclo en G2/M, sin que se observe un aumento en el número total de células (Shabalina *et al.*, 1999). Otro trabajo llevado a cabo más recientemente en la línea celular no tumoral de hígado humano L-02, obtiene similares conclusiones después de tratamientos de 72 horas (Huang *et al.*, 2013). Si bien los datos de estos autores están basados en técnicas de citometría de flujo y no diferencian células en G2 y M, parecen coincidir en gran medida con nuestras observaciones en las células HeLa y HaCaT.

Es importante mencionar que determinados estudios realizados en hepatocitos de roedores expuestos a PFOA a través de la dieta, utilizando tecnología de microarrays de ADN, indican que el compuesto produce cambios de expresión de genes relacionados con la proliferación celular (Guruge *et al.*, 2006; Rosen *et al.*, 2008). Entre ellos, destacan los genes de las ciclinas D1 y D3 y del inhibidor de CDKs p21, que participan en la regulación de la transición G1-S; así como Cdc20 (*cell-division cycle protein 20*) y aurora quinasa B, implicados en la progresión metafase-anafase. Obviamente, estos datos no son extrapolables a nuestros resultados y los de otros autores en cultivos de células humanas tratadas con PFOA. Sin embargo, podrían constituir un punto de partida para el análisis en profundidad del efecto de este contaminante sobre la proliferación de células humanas, ya que podría tratarse de un fenómeno universal independiente tanto del tipo celular como del carácter tumoral o no tumoral del tipo celular.

Con el fin de completar las pruebas de citotoxicidad basal, se realizaron observaciones microscópicas *in vivo* después de exponer las células HeLa y HaCaT a concentraciones de PFOA 50 y 100 μM en las distintas condiciones experimentales. Cuando las células vivas se incuban con sustancias tóxicas, determinadas dianas subcelulares pueden sufrir una serie de modificaciones estructurales que pasan inadvertidas utilizando los ensayos convencionales de citotoxicidad *in vitro*. En la mayoría de los casos, los cambios morfológicos se hacen evidentes una vez que el sistema bioquímico correspondiente se encuentra alterado. Sin embargo, los productos químicos también pueden interactuar directamente con ciertas estructuras celulares induciendo cambios importantes a nivel celular y subcelular y que comienzan a manifestarse casi inmediatamente después de la exposición al tóxico. Por lo tanto, la forma más conveniente de evaluar el daño citotóxico producido por los compuestos químicos en los sistemas celulares es utilizar en paralelo enfoques bioquímicos y morfológicos (Hazen *et al.*, 2010).

Una de las alteraciones morfológicas más evidentes después de los tratamientos con PFOA fue la aparición de ampollas o burbujas en la superficie de las células HeLa, un proceso conocido como *blebbing* característico de células con daños importantes en la membrana plasmática (Babiychuk *et al.*, 2011). Por su parte, las células HaCaT exhibían fenómenos de degeneración hídrica, una acumulación intracitoplasmática de agua debida a la incapacidad de las células para mantener el balance de líquidos y electrolitos regulado por las bombas Na^+/K^+ de la membrana plasmática (Henics y Wheatley, 1999). Nuestras observaciones morfológicas

sugieren por lo tanto que los tratamientos con PFOA producen una desestabilización de la membrana plasmática, la primera barrera con la que se encuentra cualquier agente tóxico que entra en contacto con las células. En concordancia con nuestros resultados se ha descrito que diversos tensioactivos perfluorados, entre los que se incluye el PFOA, aumentan la permeabilidad de la membrana plasmática en distintas líneas celulares humanas (Levitt y Liss, 1986, 1987; Hu *et al.*, 2003; Florentin *et al.*, 2011), células de hepatoma de rata (Hu *et al.*, 2003) y células sanguíneas de peces (Hu *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003), como consecuencia de sus propiedades detergentes. La alteración de las propiedades físico-químicas del plasmalema también puede ser el resultado de la unión directa de un compuesto con alguno de sus componentes. La capacidad del PFOA para interactuar con las membranas celulares es bien conocida, existiendo estudios *in vitro* con modelos artificiales de membrana que demuestran que el compuesto se incorpora fácilmente a las bicapas lipídica, perturbando sus propiedades de empaquetamiento e incrementando su fluidez (Matyszewska *et al.*, 2007). Es importante resaltar que, de la misma manera que en los ensayos cuantitativos de citotoxicidad basal, las alteraciones morfológicas detectadas en las células HeLa y HaCaT después de los tratamientos de 24 horas con PFOA no revirtieron a la situación control pese a la retirada de la droga del medio de cultivo. De hecho, desde el punto de vista morfológico, las células tratadas durante 24 horas e incubadas en un medio libre de droga durante 48 horas adicionales presentaban una gran similitud con las expuestas al PFOA durante 72 horas, al menos en la menor de las concentraciones ensayadas. Estas evidencias plantean dos posibilidades: a) el daño producido por el PFOA después de 24 horas no puede ser reparado en las 48 horas siguientes, dando lugar a una toxicidad sostenida en el tiempo; o b) el compuesto permanece en la membrana de las células una vez retirado del medio de cultivo.

D

Por último y teniendo en cuenta que algunos autores han descrito la inducción de procesos apoptóticos en células humanas expuestas a altas concentraciones de PFOA (Shabalina *et al.*, 1999; Hu y Hu, 2009; Florentin *et al.*, 2011), decidimos analizar en profundidad el significado de las burbujas o *blebs* en las células HeLa, ya que el *blebbing* se asocia habitualmente con procesos severos de lesión celular e inducción de apoptosis (Nicotera *et al.*, 1986; Mills *et al.*, 1998; Charras, 2008). En primer lugar realizamos un marcaje *in vivo* de las células combinando el colorante supravital NA con BE, un método clásico para evaluar la viabilidad celular (Singh y Stephens, 1986; Jahanmehr *et al.*, 1987; Bank, 1988). Los resultados demostraron que, a pesar de la evidente presencia de *blebs*, las células HeLa tratadas con PFOA eran viables en todas las condiciones experimentales analizadas. Para descartar definitivamente la posibilidad de que las células con burbujas se correspondiesen con células apoptóticas, decidimos asimismo realizar una inmunodetección contra caspasa 3 activa, un efector clave de la apoptosis que una vez activado conduce inexorablemente a la muerte celular (Cohen, 1997; Chowdhury *et al.*, 2008). También en este caso los resultados fueron negativos en todas las condiciones experimentales, apareciendo anecdóticamente alguna célula positiva en las concentraciones

más altas y exposiciones más prolongadas al compuesto. Estas observaciones coinciden con las obtenidas por otros autores en la línea celular HepG2, que indican que no existen incrementos en los niveles de actividad de caspasa 3, a pesar de los tratamientos con concentraciones citotóxicas de PFOA (Buhrke *et al.*, 2013).

Aunque el papel específico de los *blebs* sigue siendo controvertido (Charras, 2008; Charras y Paluch, 2008), se trata de un fenómeno frecuente durante el transcurso de procesos fisiológicos en células animales tales como la citocinesis (Fishkind *et al.*, 1991; Paluch *et al.*, 2006) o la adhesión y la migración celular (Keller y Eggli, 1998; Hagmann *et al.*, 1999; Charras *et al.*, 2008; Angus *et al.*, 2008; Fackler y Grosse, 2008). Más recientemente se ha relacionado la presencia de *blebs* con fenómenos de resistencia a las lesiones de membrana. Esta estrategia de defensa adoptada por las células puede considerarse como un mecanismo de control de daños que se activa después de que los intentos iniciales de resellado de la membrana hayan fracasado (Babiychuk *et al.*, 2011). Existen datos recientes que sugieren que las anexinas, una familia de proteínas que interaccionan de manera Ca^{2+} dependiente con los fosfolípidos de la membrana plasmática (Gerke *et al.*, 2005), podrían desempeñar un papel fundamental en este proceso (Babiychuk *et al.*, 2011). La anexina A1 en particular, implicada principalmente en procesos inflamatorios así como en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis (Lim y Pervaiz, 2007), parece ser imprescindible para una eficaz reparación de la membrana plasmática cuando una célula se enfrenta a una lesión sostenida (Potez *et al.*, 2011). Se ha demostrado que los niveles citosólicos de dicha proteína aumentan durante los procesos de *blebbing* y que esta proteína se une a la membrana plasmática en la región del cuello del *bleb* para crear un “tapón” que deja aisladas las regiones dañadas (Babiychuk *et al.*, 2008, 2009). Basándonos en estas consideraciones, determinamos mediante inmunofluorescencia indirecta la marca de anexina A1 en las células HeLa tratadas con PFOA, pudiéndose observar un incremento de la señal en el citoplasma así como en la región de los *blebs*.

En paralelo analizamos el patrón de distribución de los microfilamentos de actina mediante faloidina conjugada con TRITC, ya que la formación de los *blebs* implica la reestructuración del cortex de actina. Se ha descrito que, durante la nucleación de estas estructuras, una pequeña región de la membrana plasmática se desprende del córtex celular y se ensancha hasta formar una protuberancia de entre 1-10 μm de diámetro desprovista de actina y de otros elementos del citoesqueleto (Charras y Paluch, 2008; Charras *et al.*, 2008; Tinevez *et al.*, 2009). La entrada de contenido citoplasmático a las burbujas recién formadas es favorecida por el aumento de la presión hidrostática que genera la contracción del complejo formado por miosina II y actina cortical (Charras *et al.*, 2008; Tinevez *et al.*, 2009). Finalmente, cuando la expansión de los *blebs* se detiene, el córtex de actina se vuelve a organizar debajo de la membrana de estas estructuras (Charras *et al.*, 2008; Babiychuk *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que el *blebbing* puede representar un mecanismo directo de eliminación de

lesiones plasmalemales (Idone *et al.*, 2008) ya que, cuando el deterioro de la membrana es extremo, los *blebs* que corresponden a las regiones dañadas pueden ser expulsados de la célula (Segundo *et al.*, 1999; Keefe *et al.*, 2005). Nuestros resultados revelaron que las células HeLa tratadas con PFOA presentaban *blebs* con una intensa marca de actina bajo la membrana, pudiéndose distinguir además algunas vesículas completamente escindidas del cuerpo celular después de los tratamientos de mayor duración (24+48h y 72h). Teniendo en cuenta estas observaciones, así como la ausencia de apoptosis en nuestras condiciones experimentales, estimamos que los fenómenos de *blebbing* observados en las células HeLa expuestas al PFOA no reflejan un efecto citotóxico sino más bien una estrategia de resistencia ante lesiones de la membrana plasmática.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en las diferentes pruebas bioquímicas y morfológicas, podemos establecer que las alteraciones causadas por el PFOA en las células HeLa y HaCaT representan un proceso de adaptación al estrés. Las respuestas adaptativas al estrés citotóxico permiten a las células modular su estructura y función, pero cuando se sobrepasan los límites de adaptación se alcanza el llamado “punto de no retorno” en el que las células pueden sufrir lesiones irreversibles que culminan con la muerte. Por ello, con el fin de completar nuestro estudio, nos planteamos examinar los cultivos 8 días después del tratamiento con PFOA durante 24 horas, seleccionando en base a nuestros resultados previos la concentración 50 μ M y la proliferación celular como parámetro de medida. El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo reveló que la distribución de las células HeLa en las diferentes etapas del ciclo era equivalente en los cultivos control y en los sometidos a un pretratamiento con PFOA. Sin embargo, se observaron cambios significativos en el perfil del ciclo de las células HaCaT respecto a sus correspondientes controles, debidos principalmente al bloqueo del ciclo en la fase G0/G1. Las causas de la detención del ciclo celular en el punto de control G1 incluyen desde la exposición a radiaciones (gamma, UV) o agentes químicos genotóxicos, hasta el estrés oxidativo (Houtgraaf *et al.*, 2006). Con independencia del estímulo, y como hemos referido previamente, una parada transitoria en el periodo G1/S proporciona un tiempo adicional para reparar el daño al ADN pero, si se producen errores en el proceso, las células desencadenan respuestas de muerte programada o entran en un estado de senescencia (Rich *et al.*, 2000; Zhou y Elledge, 2000; Abraham, 2001; Rouse y Jackson, 2002). Teniendo en cuenta que no se percibieron aumentos significativos en la fracción sub-G1 apoptótica de los cultivos, optamos por realizar una detección citoquímica de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal), un reconocido biomarcador de células senescentes tanto *in vitro* como *in vivo* (Dimri *et al.*, 1995; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009).

De forma general, el término senescencia se relaciona con el envejecimiento celular y hace referencia a una progresión de eventos en los que las células pasan de dividirse activamente a no hacerlo, por acortamiento de los telómeros como resultado de la pérdida de actividad de la

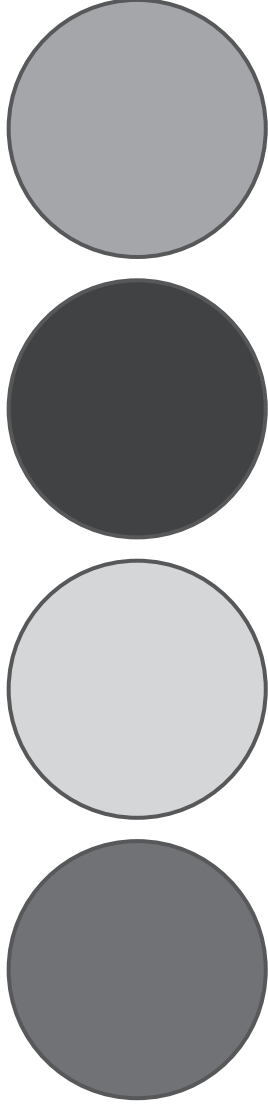
enzima telomerasa en las sucesivas divisiones celulares (Blackburn, 2001; Yang y Fogo, 2010). Asimismo, las células pueden experimentar senescencia en respuesta a diversos tipos de estrés, tales como daños en el ADN o en la estructura de la cromatina, sobreexpresión de oncogenes y estrés oxidativo, en un proceso independiente del acortamiento telomérico (Kuilman *et al.*, 2010). Esta otra forma de senescencia, conocida como senescencia prematura inducida por estrés (SIPS, *Stress-Induced Premature Senescence*), ocurre de manera relativamente rápida en los cultivos de células humanas (en cuestión de días) y comparte características básicas con la senescencia replicativa (Lloyd, 2002; Toussaint *et al.*, 2005). Es esencial destacar que la estimación de SIPS se ha recomendado para detectar efectos que pudieran manifestarse en el plazo de días o semanas después de la exposición a concentraciones subcitotóxicas de moléculas de uso industrial en fase de desarrollo (Toussaint *et al.*, 2000a).

Nuestros resultados mostraron que, como era esperable, no existían diferencias evidentes entre los cultivos control y los tratados en el caso de las células HeLa. Sin embargo, observamos un incremento significativo en el porcentaje de células HaCaT positivas para SA- β -gal respecto a sus correspondientes controles, lo que demuestra la inducción de senescencia en el cultivo una vez retirado el compuesto. Dado que un gran número de evidencias experimentales indican que los incrementos en los niveles intracelulares de ROS se asocian con procesos de senescencia (Lu y Finkel, 2008), concluimos nuestro estudio con una inmunodetección de 8-OHdG que, como hemos indicado anteriormente, es un reconocido marcador de estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2009). De acuerdo con nuestros resultados previos en la línea celular Vero (Fernández Freire *et al.*, 2008), así como con los publicados por otros autores utilizando hepatocitos primarios de peces (Liu *et al.*, 2007) y células humanas HepG2 (Shabalina *et al.*, 1999; Panaretakis *et al.*, 2001), los tratamientos con PFOA durante 24 horas produjeron estrés oxidativo en las dos líneas celulares analizadas, siendo más acusado el efecto en las células HeLa. Esta diferencia en los niveles de estrés oxidativo entre las dos líneas celulares no resulta sorprendente, habida cuenta de la mayor capacidad para generar ROS de las células tumorales (Pelicano *et al.*, 2004; Gorrini *et al.*, 2013). Sin embargo, 8 días después de la retirada del compuesto, el número de células HeLa que conservaban marca positiva para 8-OHdG resultó equivalente a los valores encontrados en los controles. Por el contrario, el porcentaje de células HaCaT positivas para 8-OHdG no se redujo de forma significativa una vez suprimido el PFOA del medio cultivo. Esto indica que dichas células se encontraron sometidas de manera sostenida en el tiempo a un nivel moderado de estrés oxidativo, que acabó desencadenando un proceso de senescencia prematura.

Es interesante mencionar en este punto que se ha demostrado la inducción de SIPS en células humanas *in vivo* (Toussaint *et al.*, 2000b) y que existen evidencias que vinculan la aparición de células senescentes con ciertas patologías relacionadas con la edad, como el cáncer (Vijg y Campisi, 2008; Sikora *et al.*, 2011). Por lo tanto, aunque se debe ser especialmente pre-

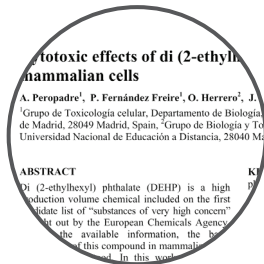
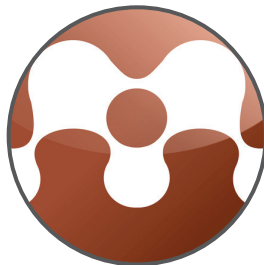
cavido a la hora de establecer comparaciones entre los efectos tóxicos observados *in vitro* y las situaciones *in vivo*, la toxicidad retardada del PFOA, descrita por primera vez en el presente estudio, debería ser considerada en el futuro a la hora de valorar el riesgo que supone para la salud la presencia persistente de este compuesto en los seres humanos.

CONCLUSIONES



- La coherencia de los resultados de la presente tesis pone de manifiesto la idoneidad del diseño experimental utilizado para realizar análisis toxicológicos que permitan definir diferentes respuestas celulares inducidas por la exposición a sustancias químicas.
- La exposición aguda a di (2-etilhexil) ftalato induce en las células Vero y HaCaT una reducción de la viabilidad celular dependiente de concentración, así como una inhibición de la proliferación celular vinculada a un retraso del ciclo celular en la fase G1.
- El di (2-etilhexil) ftalato, a dosis de relevancia clínica, induce en las células de mamífero una respuesta de estrés de retículo, un mecanismo emergente en la patogénesis y progresión de enfermedades metabólicas y otras enfermedades humanas.
- El triclosán manifiesta un comportamiento dual sobre las tasas de proliferación de las células HaCaT, MDA-MB-231 y MCF7, que depende tanto de la concentración utilizada como del tiempo de exposición.
- El estrés oxidativo es el mecanismo responsable de los efectos citotóxicos inducidos por el triclosán, tanto en células tumorales como no tumorales.
- El ácido perfluorooctanoico ejerce una citotoxicidad moderada, pero no reversible, en las células HeLa y HaCaT, asociada a un daño en la membrana plasmática.
- Las alteraciones causadas por el ácido perfluorooctanoico revelan una toxicidad retardada que desencadena en las células HeLa una respuesta adaptativa y en las células HaCaT un proceso de senescencia prematura inducida por estrés.

BIBLIOGRAFÍA



- Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15: 2177–96.
- Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, Benthem J van, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A *et al.* (2011) Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch. Toxicol.* 85: 367–485.
- Adolfsson-Erici M, Pettersson M, Parkkonen J, Sturve J (2002) Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* 46: 1485–9.
- Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP (2004) Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 775–80.
- Aldamassi M, Chen Z, Merriman B, Gussin D, Nelson S (2001) A Practical Guide to Microarray Analysis of Gene Expression. Disponible: <http://biowww.net/detail-872.html> [accessed 27 February 2014].
- Allmyr M, Adolfsson-Erici M, McLachlan MS, Sandborgh-Englund G (2006) Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Sci. Total Environ.* 372: 87–93.
- Allmyr M, Harden F, Toms L-ML, Mueller JF, McLachlan MS, Adolfsson-Erici M, Sandborgh-Englund G (2008) The influence of age and gender on triclosan concentrations in Australian human blood serum. *Sci. Total Environ.* 393: 162–7.
- Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S (2008) DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal.* 10: 891–937.
- Andersen ME, Al-Zoughool M, Croteau M, Westphal M, Krewski D (2010) The future of toxicity testing. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 13: 163–96.
- Andersen ME, Clewell HJ, Tan Y-M, Butenhoff JL, Olsen GW (2006) Pharmacokinetic modeling of saturable, renal resorption of perfluoroalkylacids in monkeys—Probing the determinants of long plasma half-lives. *Toxicology* 227: 156–64.
- Andersen ME, Krewski D (2009) Toxicity testing in the 21st century: bringing the vision to life. *Toxicol. Sci.* 107: 324–30.
- Anderson K, Andrews R, Yin L, McLeod R, MacDonald C, Hayes JD, Grant MH (1998) Cytotoxicity of xenobiotics and expression of glutathione-S-transferases in immortalised rat hepatocyte cell lines. *Hum. Exp. Toxicol.* 17: 131–7.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochem. Biokhimiia.* 70: 200–14.
- Angus AA, Lee AA, Augustin DK, Lee EJ, Evans DJ, Fleiszig SMJ (2008) *Pseudomonas aeruginosa* induces membrane blebs in epithelial cells, which are utilized as a niche for intracellular replication and motility. *Infect. Immun.* 76: 1992–2001.
- ARTAC (2004) El llamamiento de París. Disponible: http://www.artac.info/fr/appel-de-paris/texte-en-six-langues/espa-ol_000084.html. [accessed 22 December 2013]
- Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, Schwarzschild MA, Thun MJ (2006) Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 60: 197–203.

- ATSDR (2002a) *DDT, DDE Y DDD*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta. pp. 2.
- ATSDR (2002b) *Toxicological profile for di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta. pp. 336.
- Austin B, Mothersill C (2003) Basic methods and media for eukaryotic cells in vitro. En: *In vitro methods in aquatic toxicology*. Springer, Berlin. pp. 9–16.
- Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Draeger A (2008) Fluorescent annexin A1 reveals dynamics of ceramide platforms in living cells. *Traffic* 9: 1757–75.
- Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, Draeger A (2011) Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death Differ.* 18: 80–9.
- Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, Draeger A (2009) Intracellular Ca(2+) operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death Differ.* 16: 1126–34.
- Back SH, Kaufman RJ (2012) Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 767–93.
- Bailey AM, Constantinidou C, Ivens A, Garvey MI, Webber MA, Coldham N, Hobman JL, Wain J, Woodward MJ, Piddock LJ V (2009) Exposure of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to triclosan induces a species-specific response, including drug detoxification. *J. Antimicrob. Chemother.* 64: 973–85.
- Bally MB, Opheim DJ, Shertzer HG (1980) Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances the release of lysosomal enzymes from alveolar macrophages during phagocytosis. *Toxicology* 18: 49–60.
- Bank HL (1988) Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24: 266–73.
- Banks RE, Smart BE, Tatlow JC (1994) *Organofluorine Chemistry. Principles and Commercial Applications*. 1st ed. Plenum, New York. pp. 620.
- Barceló D, López de Alda M (2008) *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas, Universidad de Sevilla. pp. 27.
- Barile FA (2008) *Principles of toxicology testing*. Informa Healthcare USA, New York. pp. 312.
- Barrera G (2012) Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.* 2012: 137289.
- Barros SP, Wirojchanasak S, Barrow DA, Panagakos FS, Devizio W, Offenbacher S (2010) Triclosan inhibition of acute and chronic inflammatory gene pathways. *J. Clin. Periodontol.* 37: 412–8.
- Bartosz G (2009) Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* 77: 1303–15.
- Basketter DA, Clewell H, Kimber I, Rossi A, Blaauboer B, Burrier R, Daneshian M, Eskes C, Goldberg A, Hasiwa N *et al.* (2012) A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing - t4 report. *ALTEX* 29: 3–91.
- Bedard K, MacDonald N, Collins J, Cribb A (2004) Cytoprotection following endoplasmic reticulum stress protein induction in continuous cell lines. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94: 124–31.
- Bello J, López de Cerain A (2001) Los métodos biológicos. En: *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. Editorial Diaz de Santos, Madrid. pp. 307–25.

- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2: 326–32.
- Bester K (2005) Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 9–17.
- Betts JC, McLaren A, Lennon MG, Kelly FM, Lukey PT, Blakemore SJ, Duncan K (2003) Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2903–13.
- Bhargava HN, Leonard PA (1996) Triclosan: Applications and safety. *Am. J. Infect. Control* 24: 209–18.
- Bhat FA, Ramajayam G, Parameswari S, Vignesh RC, Karthikeyan S, Senthilkumar K, Karthikeyan GD, Balasubramanian K, Arunakaran J, Srinivasan N (2013) Di 2-ethyl hexyl phthalate affects differentiation and matrix mineralization of rat calvarial osteoblasts--in vitro. *Toxicol. In Vitro* 27: 250–6.
- Bhattacharya S, Zhang Q, Carmichael PL, Boekelheide K, Andersen ME (2011) Toxicity testing in the 21 century: defining new risk assessment approaches based on perturbation of intracellular toxicity pathways. *PLoS One* 6: e20887.
- Binelli a, Cogni D, Parolini M, Riva C, Provini a (2009a) Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to triclosan and trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 150: 50–6.
- Binelli A, Cogni D, Parolini M, Riva C, Provini A (2009b) In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes. *Aquat. Toxicol.* 91: 238–44.
- Blackburn EH (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106: 661–73.
- Boekelheide K, Andersen ME (2010) A mechanistic redefinition of adverse effects - a key step in the toxicity testing paradigm shift. *ALTEX* 27: 243–52.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y (2008) GammaH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8: 957–67.
- Boonstra J, Post JA (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1–13.
- Borenfreund E, Puerner JA (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24: 119–24.
- Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hülsen A, Fasching C, Cremer T, Fusenig NE (1997) Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes. Chromosomes Cancer* 19: 201–14.
- Braakman I, Bulleid NJ (2011) Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 80: 71–99.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–54.
- Brausch JM, Connors KA, Brooks BW, Rand GM (2012) Human pharmaceuticals in the aquatic

environment: a review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 218: 1–99.

Brausch JM, Rand GM (2011) A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82: 1518–32.

Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS (2006) Pesticides and Parkinson's disease: is there a link? *Environ. Health Perspect.* 114: 156–64.

Buchberger A, Bukau B, Sommer T (2010) Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol. Cell* 40: 238–52.

Buck RC, Franklin J, Berger U, Conder JM, Cousins IT, Voogt P de, Jensen AA, Kannan K, Mabury SA, Leeuwen SPJ van (2011) Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7: 513–41.

Buhrke T, Kibellus A, Lampen A (2013) In vitro toxicological characterization of perfluorinated carboxylic acids with different carbon chain lengths. *Toxicol. Lett.* 218: 97–104.

Bull VH, Thiede B (2012) Proteome analysis of tunicamycin-induced ER stress. *Electrophoresis* 33: 1814–23.

Burris TP, Busby SA, Griffin PR (2012) Targeting orphan nuclear receptors for treatment of metabolic diseases and autoimmunity. *Chem. Biol.* 19: 51–9.

Burrows CJ, Muller JG (1998) Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem. Rev.* 98: 1109–52.

Bus JS, Becker RA (2009) Toxicity testing in the 21st

century: a view from the chemical industry. *Toxicol. Sci.* 112: 297–302.

Butenhoff JL, Gaylor DW, Moore JA, Olsen GW, Rodricks J, Mandel JH, Zobel LR (2004) Characterization of risk for general population exposure to perfluorooctanoate. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 39: 363–80.

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* 424: 9–21.

Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ (1974) Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 661–74.

Calabrese EJ (2005) Toxicological awakenings: the rebirth of hormesis as a central pillar of toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204: 1–8.

Calabrese EJ, Baldwin LA (1997) The dose determines the stimulation (and poison): Development of a chemical hormesis database. *Int. J. Toxicol.* 16: 545–59.

Calabrese EJ, Baldwin LA (2003) The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicol. Sci.* 71: 246–50.

Calafat AM, Kuklanyik Z, Caudill SP, Reidy JA, Needham LL (2006) Perfluorochemicals in pooled serum samples from United States residents in 2001 and 2002. *Environ. Sci. Technol.* 40: 2128–34.

Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL (2008) Urinary concentrations of triclosan in the U.S. population: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 116: 303–7.

Caldwell JC (2012) DEHP: genotoxicity and potential carcinogenic mechanisms-a review. *Mutat.*

- Res. 751: 82–157.
- Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M, Gallo G, Pojana G, Marcomini A (2007) Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non target organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145: 464–72.
- Cann KL, Hicks GG (2007) Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem. Cell Biol.* 85: 663–74.
- Capdevielle M, Egmond R Van, Whelan M, Versteeg D, Hofmann-Kamensky M, Inauen J, Cunningham V, Woltering D (2008) Consideration of exposure and species sensitivity of triclosan in the freshwater environment. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 15–23.
- Carson R (1962) *Silent Spring*. Houghton Mifflin, Boston. pp. 376.
- CAS (2013) Chemical Abstracts Service Home Page. Disponible: <https://www.cas.org/> [accessed 30 December 2013].
- Castaño A, Repetto G (2008) Técnicas alternativas. Generalidades. En: Ciencia y tecnología del animal de laboratorio. volumen II (J. Martín Zúñiga, J. M. Orella Muriana, y J. Tur Marí, eds.). Universidad de Alcalá. Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio, Alcalá de Henares. pp. 261–300.
- Charras G, Paluch E (2008) Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 730–6.
- Charras GT (2008) A short history of blebbing. *J. Microsc.* 231: 466–78.
- Charras GT, Coughlin M, Mitchison TJ, Mahadevan L (2008) Life and times of a cellular bleb. *Biophys. J.* 94: 1836–53.
- Chen LB (1989) Fluorescent labeling of mitochondria. *Methods Cell Biol.* 29: 103–23.
- Chen R, Dai RY, Duan CY, Liu YP, Chen SK, Yan DM, Chen CN, Wei M, Li H (2011) Unfolded protein response suppresses cisplatin-induced apoptosis via autophagy regulation in human hepatocellular carcinoma cells. *Folia Biol. (Praha).* 57: 87–95.
- Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA, St Clair DK (2007) Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol. Interv.* 7: 147–56.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156–9.
- Chowdhury D, Keogh M-C, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J (2005) gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* 20: 801–9.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008) Caspases - an update. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 151: 10–27.
- Ciniglia C, Cascone C, Giudice R Lo, Pinto G, Pollio A, Andreozzi R, Lyberatos G (2005) Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of Triclosan to *C. ehrenbergii*. *J. Hazard. Mater.* 122: 227–32.
- Clemedson C, Nordin-Andersson M, Bjerregaard HF, Clausen J, Forsby A, Gustafsson H, Hansson U, Isomaa B, Jørgensen C, Kolman A *et al.* (2002) Development of an in vitro test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. *Evaluation-guided*

- Development of New In Vitro Test Batteries. *Altern. Lab. Anim.* 30: 313–21.
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326 (Pt 1: 1–16.
- Colborn T, Saal FS vom, Soto AM (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101: 378–84.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17: 1195–214.
- Cortés F, Mateos S, Pastor N, Domínguez I (2004) Toward a comprehensive model for induced endoreduplication. *Life Sci.* 76: 121–35.
- Cox JS, Shamu CE, Walter P (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73: 1197–206.
- Cribb AE, Peyrou M, Muruganandan S, Schneider L (2005) The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity. *Drug Metab. Rev.* 37: 405–42.
- Crofton KM, Paul KB, Devito MJ, Hedge JM (2007) Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 24: 194–7.
- Cunningham ML (2006) Putting the fun into functional toxicogenomics. *Toxicol. Sci.* 92: 347–8.
- D’Assoro AB, Busby R, Suino K, Delva E, Almodovar-Mercado GJ, Johnson H, Folk C, Farrugia DJ, Vasile V, Stivala F, Salisbury JL (2004) Genotoxic stress leads to centrosome amplification in breast cancer cell lines that have an inactive G1/S cell cycle checkpoint. *Oncogene* 23: 4068–75.
- Dann AB, Hontela A (2011) Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 31: 285–311.
- Darbre PD (2006) Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20: 121–43.
- Darbre PD, Charles AK (2010) Environmental oestrogens and breast cancer: evidence for combined involvement of dietary, household and cosmetic xenoestrogens. *Anticancer Res.* 30: 815–27.
- Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107 Suppl : 907–38.
- David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000a) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *Toxicol. Sci.* 58: 377–85.
- David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000b) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol. Sci.* 55: 377–85.
- Davoli T, Lange T de (2011) The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 585–610.
- Dayan AD (2007) Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk. *Food Chem. Toxicol.* 45: 125–9.
- Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O (2009) Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 4: 1798–806.
- Deepa PR, Vandhana S, Jayanthi U, Krishnakumar S (2012) Therapeutic and toxicologic evaluation of

- anti-lipogenic agents in cancer cells compared with non-neoplastic cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 110: 494–503.
- Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89: 271–7.
- Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C (2009) PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Mol. Cell. Endocrinol.* 304: 43–8.
- Dierickx PJ (2003) Evidence for delayed cytotoxicity effects following exposure of rat hepatoma-derived Fa32 cells: implications for predicting human acute toxicity. *Toxicol. In Vitro* 17: 797–801.
- Dierickx PJ, Ekwall B (1992) Long-term cytotoxicity testing of the first twenty MEIC chemicals by the determination of the protein content in human embryonic lung cells. *Altern. Lab. Anim.*
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 9363–7.
- Ding W-X, Ni H-M, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin X-M (2007) Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am. J. Pathol.* 171: 513–24.
- Dinwiddie MT, Terry PD, Chen J (2014) Recent evidence regarding triclosan and cancer risk. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11: 2209–17.
- ECHA (2013) *Inclusion of substances of very high concern in the candidate list (Decision by the Executive Director)*. European Chemicals Agency, Helsinki. pp. 4.
- ECHA (2008) *Member State Committee Support Document for Identification of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) as a Substance of Very High Concern*. European Chemicals Agency, Helsinki. pp. 22.
- ECVAM (2002) Acute lethal toxicity. En: *Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects*. European Centre for the Validation of Alternative Methods, Ispra. pp. 27–33.
- Edlund C, Ganning AE, Dallner G (1986) The influence of prolonged di(2-ethylhexyl)phthalate treatment on the dolichol and dolichyl-P content of rat liver. *Chem. Biol. Interact.* 57: 255–70.
- Edwards TM, Myers JP (2007) Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ. Health Perspect.* 115: 1264–70.
- Eggen T, Moeder M, Arukwe A (2010) Municipal landfill leachates: a significant source for new and emerging pollutants. *Sci. Total Environ.* 408: 5147–57.
- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer B., Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot J-C, Pieters R, Kleiner J (2002) *Methods of in vitro toxicology*. Food Chem. Toxicol. 40: 193–236.
- Ekwall B (1995) The basal cytotoxicity concept. *World Congr. Altern. Anim. Use Life Sci. Educ. Res. Test.* 11: 721–5.
- Ekwall B, Clemenson C, Ekwall C, Ring P, Romert L (1999) EDIT: a new international multicentre programme to develop and evaluate batteries of in vitro tests for acute and chronic systemic toxicity. *Altern. Lab. Anim.* 27: 339–49.

- Ekwall B, Ekwall K (1988) Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *Altern. Lab. Anim.* 15: 193–201.
- EPA (2008) *Cancer assessment document: evaluation of the carcinogenic potential of triclosan*. Environmental Protection Agency, Washington. pp. 50.
- EPA (2009) *Long-Chain Perfluorinated Chemicals (PFCs) Action Plan*. Environmental Protection Agency, Washington. pp. 24.
- EPA (2002) *Revised draft hazard assessment of perfluorooctanoic acid and its salts*. Environmental Protection Agency, Washington. pp. 107.
- EPA (2006) *Science Advisory Board review of EPA's draft risk assessment of potential human health effects associated with PFOA and its salts*. Environmental Protection Agency, Washington. pp. 39.
- EPA (2014) Triclosan Facts. Disponible: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/triclosan_fs.htm [accessed 4 March 2014].
- EPA (2010) *Triclosan Facts US EPA*. Environmental Protection Agency, Washington. pp. 2.
- Essmann F, Engels IH, Totzke G, Schulze-Osthoff K, Jänicke RU (2004) Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res.* 64: 7065–72.
- EU (2010) *Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos*. Diario Oficial de la Unión Europea, Luxembourg. pp. 47.
- EU (2009) *Reglamento (CE) n° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos*. Diario Oficial de la Unión Europea, Luxembourg. pp. 151.
- EU (2006) *Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de*. Diario Oficial de la Unión Europea, Luxembourg. pp. 278.
- EU (2013) *Séptimo informe sobre las estadísticas relativas al número de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea*. Comisión Europea, Bruselas. pp. 15.
- Fabre N, Arrivet E, Trancard J, Bichet N, Roome NO, Prenz A, Vericat JA (2003) A new hepatoma cell line for toxicity testing at repeated doses. *Cell Biol. Toxicol.* 19: 71–82.
- Fackler OT, Grosse R (2008) Cell motility through plasma membrane blebbing. *J. Cell Biol.* 181: 879–84.
- Fagone P, Jackowski S (2009) Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J. Lipid Res.* 50 Suppl: S311–6.
- Fair PA, Lee H-B, Adams J, Darling C, Pacepavicius G, Alaei M, Bossart GD, Henry N, Muir D (2009) Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. *Environ. Pollut.* 157: 2248–54.
- Favier A (2006) [Oxidative stress in human diseases]. *Ann. Pharm. françaises* 64: 390–6.
- FDA (2002) *Safety assessment of di (2-ethylhexyl)*

- phthalate (DEHP) released from PVC medical devices*. Food and Drug Administration, Rockville. pp. 119.
- Feige J, Gerber A, Casals-Casas C, Yang Q, Winkler C, Bedu E, Bueno M, Gelman L, Auwerx J, Gonzalez F, Desvergne B (2010) The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 118: 234–41.
- Feige JN, Auwerx J (2007) Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol.* 17: 292–301.
- Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76: 122–59.
- Fernández Freire P, Labrador V, Pérez Martín JM, Hazen MJ (2005) Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology* 210: 37–44.
- Fernández Freire P, Pérez Martín JM, Herrero O, Peropadre A, la Peña E de, Hazen MJ (2008) In vitro assessment of the cytotoxic and mutagenic potential of perfluorooctanoic acid. *Toxicol. In Vitro* 22: 1228–33.
- Fernández Freire P, Peropadre A, Pérez Martín JM, Herrero O, Hazen MJ (2009) An integrated cellular model to evaluate cytotoxic effects in mammalian cell lines. *Toxicol. Vitro.* 23: 1553–8.
- Fishkind DJ, Cao LG, Wang YL (1991) Microinjection of the catalytic fragment of myosin light chain kinase into dividing cells: effects on mitosis and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 114: 967–75.
- Florentin A, Deblonde T, Diguio N, Hautemaniere A, Hartemann P (2011) Impacts of two perfluorinated compounds (PFOS and PFOA) on human hepatoma cells: cytotoxicity but no genotoxicity? *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214: 493–9.
- Foran CM, Bennett ER, Benson WH (2000) Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Mar. Environ. Res.* 50: 153–6.
- Fromme H, Mosch C, Morovitz M, Alba-Alejandre I, Boehmer S, Kiranoglu M, Faber F, Hannibal I, Genzel-Boroviczeny O, Koletzko B, Völkel W (2010) Pre- and postnatal exposure to perfluorinated compounds (PFCs). *Environ. Sci. Technol.* 44: 7123–9.
- Fromme H, Tittlemier SA, Völkel W, Wilhelm M, Twardella D (2009) Perfluorinated compounds--exposure assessment for the general population in Western countries. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212: 239–70.
- Fusenig NE, Boukamp P (1998) Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol. Carcinog.* 23: 144–58.
- Gagné F, Blaise C, Fournier M, Hansen PD (2006) Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 143: 179–86.
- Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxy radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177: 91–104.
- Ganning AE, Brunk U, Edlund C, Elhammer A, Dallner G (1987) Effects of prolonged administration of phthalate ester on the liver. *Environ. Health Perspect.* 73: 251–8.

- Gant TW (2007) Novel and future applications of microarrays in toxicological research. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 3: 599–608.
- Garle MJ, Fentem JH, Fry JR (1994) In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. *Toxicol. In Vitro* 8: 1303–12.
- Gaume B, Bourgougnon N, Auzoux-Bordenave S, Roig B, Bot B Le, Bedoux G (2012) In vitro effects of triclosan and methyl-triclosan on the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 156: 87–94.
- Gee RH, Charles A, Taylor N, Darbre PD (2008) Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *J. Appl. Toxicol.* 28: 78–91.
- Gennari A, Berghe C van den, Casati S, Castell J, Clemenson C, Coecke S, Colombo A, Curren R, Dal Negro G, Goldberg A *et al.* (2004) Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 50. *Altern. Lab. Anim.* 32: 437–59.
- Gerbracht U, Einig C, Oesterle D, Deml E, Schlatterer B, Eigenbrodt E (1990) Di(2-ethylhexyl)phthalate alters carbohydrate enzyme activities and foci incidence in rat liver. *Carcinogenesis* 11: 2111–5.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 449–61.
- Gey G, Coffman W, M K (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 264–5.
- Giesy JP, Kannan K (2002) Perfluorochemical surfactants in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 36: 146A–152A.
- Gilkerson RW, Margineantu DH, Capaldi RA, Selker JM (2000) Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells. *FEBS Lett.* 474: 1–4.
- Gillum N, Karabekian Z, Swift LM, Brown RP, Kay MW, Sarvazyan N (2009) Clinically relevant concentrations of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) uncouple cardiac syncytium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236: 25–38.
- Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R (2009) Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 46: 241–81.
- Gomase VS, Tagore S, Kale K V (2008) Microarray: an approach for current drug targets. *Curr. Drug Metab.* 9: 221–31.
- Gómez-Lechon MJ, Castell J V (1995) The use of in vitro methods for the evaluation of the potential risk of toxicity of xenobiotics. En: *Cell Biology in the Environmental Toxicology*. University of the Basque Country Press Service, Bilbao. pp. 259–77.
- Gorman AM, Healy SJM, Jäger R, Samali A (2012) Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol. Ther.* 134: 306–16.
- Gorrini C, Harris IS, Mak TW (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12: 931–47.
- Grigoriev IS, Chernobelskaya AA, Vorobjev IA (1997) Quantitative analysis of the movements of cytoplasmic granules in polarized fibroblasts. *Membr. Cell Biol.* 11: 195–211.
- Guillén J, Bernabeu A, Shapiro S, Villalaín J (2004) Location and orientation of Triclosan in phospholipid model membranes. *Eur. Biophys. J.* 33: 448–53.

- Guillouzo A (1998) Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ. Health Perspect.* 106: 511–32.
- Guo L-W, Wu Q, Green B, Nolen G, Shi L, Losurdo J, Deng H, Bauer S, Fang J-L, Ning B (2012) Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262: 117–23.
- Gupta RK, Singh JM, Leslie TC, Meachum S, Flaws JA, Yao HH-C (2010) Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242: 224–30.
- Guruge KS, Yeung LWY, Yamanaka N, Miyazaki S, Lam PKS, Giesy JP, Jones PD, Yamashita N (2006) Gene expression profiles in rat liver treated with perfluorooctanoic acid (PFOA). *Toxicol. Sci.* 89: 93–107.
- Gützkow KB, Haug LS, Thomsen C, Sabaredzovic A, Becher G, Brunborg G (2012) Placental transfer of perfluorinated compounds is selective--a Norwegian Mother and Child sub-cohort study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 215: 216–9.
- Hagmann J, Burger MM, Dagan D (1999) Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.* 73: 488–99.
- Halliwell B (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 476: 107–12.
- Halliwell B (2007) Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* 401: 1.
- Hapala I, Marza E, Ferreira T (2011) Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation. *Biol. Cell* 103: 271–85.
- Harada K, Inoue K, Morikawa A, Yoshinaga T, Saito N, Koizumi A (2005) Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environ. Res.* 99: 253–61.
- Hartemann P, Flemming H-C, Hunter P, Villesot D, Exner M, Deblonde T, Cossu-Leguille C (2011) Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214: 442–8.
- Hartlerode AJ, Scully R (2009) Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem. J.* 423: 157–68.
- Hartung T (2009) Toxicology for the twenty-first century. *Nature* 460: 208–12.
- Hartung T, Daston G (2009) Are in vitro tests suitable for regulatory use? *Toxicol. Sci.* 111: 233–7.
- Hatch EE, Nelson JW, Stahlhut RW, Webster TF (2010) Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int. J. Androl.* 33: 324–32.
- Haug LS, Huber S, Becher G, Thomsen C (2011) Characterisation of human exposure pathways to perfluorinated compounds--comparing exposure estimates with biomarkers of exposure. *Environ. Int.* 37: 687–93.
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 10: 3787–99.
- Hazen MJ, Fernández Freire P, Pérez Martín JM, Peropadre A, Herrero O, Carvajal López L, Labrador V (2010) The importance of microscopic analysis for accurate interpretation of chemical-induced cytotoxicity. *En:*

Microscopy science technology applications and education. Formatex. pp. 1–9.

Heath RJ, Li J, Roland GE, Rock CO (2000) Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene. *J. Biol. Chem.* 275: 4654–9.

Hekster FM, Laane RWPM, Voogt P de (2003) Environmental and toxicity effects of perfluoroalkylated substances. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 179: 99–121.

Henics T, Wheatley DN (1999) Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. *Biol. Cell* 91: 485–98.

Henry ND, Fair PA (2013) Comparison of in vitro cytotoxicity, estrogenicity and anti-estrogenicity of triclosan, perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid. *J. Appl. Toxicol.* 33: 265–72.

Herrero O, Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Carvajal López L, Peropadre A, Hazen MJ (2012) Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutat. Res.* 743: 20–4.

Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J (2007) Phthalates: toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210: 623–34.

Hinderliter PM, Mylchreest E, Gannon SA, Butenhoff JL, Kennedy GL (2005) Perfluorooctanoate: Placental and lactational transport pharmacokinetics in rats. *Toxicology* 211: 139–48.

Högberg J, Hanberg A, Berglund M, Skerfving S, Remberger M, Calafat AM, Filipsson AF, Jansson B, Johansson N, Appelgren M, Håkansson H (2008) Phthalate diesters and their metabolites

in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ. Health Perspect.* 116: 334–9.

Honkisz E, Zieba-Przybylska D, Wojtowicz AK (2012) The effect of triclosan on hormone secretion and viability of human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Reprod. Toxicol.* 34: 385–92.

Horn O, Nalli S, Cooper D, Nicell J (2004) Plasticizer metabolites in the environment. *Water Res.* 38: 3693–8.

Houtgraaf JH, Versmissen J, Giessen WJ van der (2006) A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc. Revasc. Med.* 7: 165–72.

Høyer-Hansen M, Jäätelä M (2007) Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 14: 1576–82.

Hu W yue, Jones PD, DeCoen W, King L, Fraker P, Newsted J, Giesy JP (2003) Alterations in cell membrane properties caused by perfluorinated compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 135: 77–88.

Hu X-Z, Hu D-C (2009) Effects of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate exposure on hepatoma Hep G2 cells. *Arch. Toxicol.* 83: 851–61.

Huang Q, Zhang J, Martin FL, Peng S, Tian M, Mu X, Shen H (2013) Perfluorooctanoic acid induces apoptosis through the p53-dependent mitochondrial pathway in human hepatic cells: A proteomic study. *Toxicol. Lett.* 223: 211–20.

Hung C-C, Ichimura T, Stevens JL, Bonventre J V (2003) Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum

- stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 278: 29317–26.
- IARC (2012) *Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water*. International Agency for Research on Cancer, Lyon. pp. 610.
- Idone V, Tam C, Goss JW, Toomre D, Pypaert M, Andrews NW (2008) Repair of injured plasma membrane by rapid Ca^{2+} -dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* 180: 905–14.
- Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L, Epstein S, Belpomme D (2007) Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed. Pharmacother.* 61: 640–58.
- ISO (2009) *ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. International Standardization Organization, Geneva. pp. 5.
- Ito Y, Nakajima T (2008) PPARalpha- and DEHP-induced cancers. *PPAR Res.* 2008: 759716.
- Ivanov A, Cragg MS, Erenpreisa J, Emzinsh D, Lukman H, Illidge TM (2003) Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J. Cell Sci.* 116: 4095–106.
- Jahanmehr SA, Hyde K, Geary CG, Cinkotai KI, Maciver JE (1987) Simple technique for fluorescence staining of blood cells with acridine orange. *J. Clin. Pathol.* 40: 926–9.
- Jalava PI, Salonen RO, Pennanen AS, Sillanpää M, Hälönen AI, Happonen MS, Hillamo R, Brunekreef B, Katsouyanni K, Sunyer J, Hirvonen M-R (2007) Heterogeneities in inflammatory and cytotoxic responses of RAW 264.7 macrophage cell line to urban air coarse, fine, and ultrafine particles from six European sampling campaigns. *Inhal. Toxicol.* 19: 213–25.
- Jang H-J, Chang MW, Toghrol F, Bentley WE (2008) Microarray analysis of toxicogenomic effects of triclosan on *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 695–707.
- Jirasripongpun K, Wongarethornkul T, Mulligabavin S (2008) Risk assessment of triclosan using animal cell lines. *Kasetsart J. - Nat. Sci.* 42: 353–9.
- Jo Y, Hartman IZ, DeBose-Boyd RA (2013) Ancient ubiquitous protein-1 mediates sterol-induced ubiquitination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in lipid droplet-associated endoplasmic reticulum membranes. *Mol. Biol. Cell* 24: 169–83.
- Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P (2008) Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice. *Neurotoxicology* 29: 160–9.
- Jones OA, Voulvoulis N, Lester JN (2001) Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. *Environ. Technol.* 22: 1383–94.
- Jones PD, Hu W, Coen W De, Newsted JL, Giesy JP (2003) Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2639–49.
- Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS (2000) Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. *Am. J. Infect. Control* 28: 184–96.
- Kamijo Y, Hora K, Nakajima T, Kono K, Takahashi K, Ito Y, Higuchi M, Kiyosawa K, Shigematsu H, Gonzalez FJ, Aoyama T (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects

against glomerulonephritis induced by long-term exposure to the plasticizer di-(2-ethylhexyl) phthalate. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 176–88.

Kanetoshi A, Katsura E, Ogawa H, Ohyama T, Kaneshima H, Miura T (1992) Acute toxicity, percutaneous absorption and effects on hepatic mixed function oxidase activities of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (Irgasan DP300) and its chlorinated derivatives. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 91–8.

Kang J, Dai X-S, Yu T-B, Wen B, Yang Z-W (2005) Glycogen accumulation in renal tubules, a key morphological change in the diabetic rat kidney. *Acta Diabetol.* 42: 110–6.

Kannan K, Choi J-W, Iseki N, Senthilkumar K, Kim DH, Masunaga S, Giesy JP (2002) Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea. *Chemosphere* 49: 225–31.

Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, Fillmann G, Kumar KS, Loganathan BG, Mohd MA, Olivero J, Wouwe N Van, Yang JH, Aldoust KM (2004) Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ. Sci. Technol.* 38: 4489–95.

Kannan K, Koistinen J, Beckmen K, Evans T, Gorzelany JF, Hansen KJ, Jones PD, Helle E, Nyman M, Giesy JP (2001) Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals. *Environ. Sci. Technol.* 35: 1593–8.

Karagiannis TC, El-Osta A (2004) Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 2137–47.

Kärroman A, Domingo JL, Llebaria X, Nadal M, Bigas E, Bavel B van, Lindström G (2010) Biomonitoring perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: concentrations and trends in human liver and

milk samples. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 17: 750–8.

Kärroman A, Ericson I, Bavel B van, Darnerud PO, Aune M, Glynn A, Lignell S, Lindström G (2007) Exposure of perfluorinated chemicals through lactation: levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996–2004, in Sweden. *Environ. Health Perspect.* 115: 226–30.

Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, Lieberman J (2005) Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 23: 249–62.

Keller DA, Juberg DR, Catlin N, Farland WH, Hess FG, Wolf DC, Doerrer NG (2012) Identification and characterization of adverse effects in 21st century toxicology. *Toxicol. Sci.* 126: 291–7.

Keller H, Eggl P (1998) Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell Motil. Cytoskeleton* 41: 181–93.

Kennedy GL, Butenhoff JL, Olsen GW, O'Connor JC, Seacat AM, Perkins RG, Biegel LB, Murphy SR, Farrar DG (2004) The toxicology of perfluorooctanoate. *Crit. Rev. Toxicol.* 34: 351–84.

Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27: 247–54.

Kim H, Yoon SC, Lee TY, Jeong D (2009) Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol. Lett.* 184: 13–7.

Kim IY, Han SY, Moon A (2004) Phthalates inhibit tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 human

- breast cancer cells. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 67: 2025–35.
- Kimata Y, Kohno K (2011) Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 135–42.
- Kissa E (2001) *Fluorinated Surfactants and Repellents*. 2nd ed. CRC Press, New York. pp. 640.
- Klemm EJ, Spooner E, Ploegh HL (2011) Dual role of ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) in lipid droplet accumulation and endoplasmic reticulum (ER) protein quality control. *J. Biol. Chem.* 286: 37602–14.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1202–11.
- Komissarova E V, Saha SK, Rossman TG (2005) Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202: 99–107.
- Kora S, Sado M, Terada H (1988) Effect of the plasticizer di-(2-ethylhexyl)phthalate on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria: modification of the function of the adenine nucleotide translocator. *J. Pharmacobiodyn.* 11: 773–8.
- Kortenkamp A (2006) Breast cancer, oestrogens and environmental pollutants: a re-evaluation from a mixture perspective. *Int. J. Androl.* 29: 193–8.
- Krewski D, Acosta D, Andersen M, Anderson H, Bailar JC, Boekelheide K, Brent R, Charnley G, Cheung VG, Green S *et al.* (2010) Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 13: 51–138.
- Krewski D, Andersen ME, Mantus E, Zeise L, Kavlock RJ, Austin CP, Tice RR (2009) Toxicity testing in the 21st century: implications for human health risk assessment. *Risk Anal.* 29: 474–9.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* 40: 280–93.
- Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 711: 193–201.
- Kudo N, Kawashima Y (2003) Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals. *J. Toxicol. Sci.* 28: 49–57.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010) The essence of senescence. *Genes Dev.* 24: 2463–79.
- Kültz D (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 225–57.
- Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J (2009) Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury and death. En: *Pathologic basis of disease*. Saunders Elsevier, Philadelphia. pp. 1–32.
- Kuo LJ, Yang L-X (1998) Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22: 305–9.
- Labrador V, Fernández Freire P, Pérez Martín JM, Hazen MJ (2007) Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells. *Cell Biol. Toxicol.* 23: 189–99.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural

proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–5.

Landkocz Y, Poupin P, Atienzar F, Vasseur P (2011) Transcriptomic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in Syrian hamster embryo cells: an important role of early cytoskeleton disturbances in carcinogenesis? *BMC Genomics* 12: 524.

Lang P, Yeow K, Nichols A, Scheer A (2006) Cellular imaging in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5: 343–56.

Lapworth DJ, Baran N, Stuart ME, Ward RS (2012) Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* 163: 287–303.

Latini G, Scoditti E, Verrotti A, Felice C De, Massaro M (2008) Peroxisome proliferator-activated receptors as mediators of phthalate-induced effects in the male and female reproductive tract: epidemiological and experimental evidence. *PPAR Res.* 2008: 359267.

Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J (2007) Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.* 99: 366–94.

Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Narotsky MG, Rogers JM, Lindstrom AB, Strynar MJ (2006) Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicol. Sci.* 90: 510–8.

Lau X, Zhang Y, Kelly DJ, Stapleton DI (2013) Attenuation of Armanni-Ebstein lesions in a rat model of diabetes by a new anti-fibrotic, anti-inflammatory agent, FT011. *Diabetologia* 56: 675–9.

Lee AS (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of

endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35: 373–81.

Lee J-S, Mendez R, Heng HH, Yang Z-Q, Zhang K (2012) Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am. J. Transl. Res.* 4: 102–13.

Leist M, Hartung T, Nicotera P (2008) The dawning of a new age of toxicology. *ALTEX* 25: 103–14.

Lettieri T (2006) Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 114: 4–9.

Levenson AS, Jordan VC (1997) MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 57: 3071–8.

Levitt D, Liss A (1987) Perfluorinated fatty acids alter merocyanine 540 dye binding to plasma membranes. *J. Toxicol. Environ. Health* 20: 303–16.

Levitt D, Liss A (1986) Toxicity of perfluorinated fatty acids for human and murine B cell lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86: 1–11.

Li J, Ni M, Lee B, Barron E, Hinton D, Lee A (2008) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ.* 15: 1460–71.

Li LH, Jester WF, Laslett AL, Orth JM (2000) A single dose of Di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decreases cyclin D2 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166: 222–9.

Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R, Adler S, Riebeling C, Luch A (2011) Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Arch. Toxicol.* 85: 841–58.

- Lim LHK, Pervaiz S (2007) Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* 21: 968–75.
- Liu B, Wang Y, Fillgrove KL, Anderson VE (2002) Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49: 187–93.
- Liu C, Yu K, Shi X, Wang J, Lam PKS, Wu RSS, Zhou B (2007) Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat. Toxicol.* 82: 135–43.
- Lloyd AC (2002) Limits to lifespan. *Nat. Cell Biol.* 4: E25–7.
- Lopez-Espinosa M-J, Granada A, Araque P, Molina-Molina J-M, Puertollano M-C, Rivas A, Fernández M, Cerrillo I, Olea-Serrano M-F, López C, Olea N (2007) Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food Addit. Contam.* 24: 95–102.
- Lovekamp-Swan T, Davis BJ (2003) Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health Perspect.* 111: 139–45.
- Lu T, Finkel T (2008) Free radicals and senescence. *Exp. Cell Res.* 314: 1918–22.
- Lupu R, Menendez JA (2006) Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7: 483–93.
- Lyamzaev KG, Izyumov DS, Avetisyan A V, Yang F, Pletjushkina OY, Chernyak B V (2004) Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochim. Pol.* 51: 553–62.
- Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E, Saunders M, Skaare JU (2009) Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 12: 225–49.
- Lygre H, Moe G, Skålevik R, Holmsen H (2003) Interaction of triclosan with eukaryotic membrane lipids. *Eur. J. Oral Sci.* 111: 216–22.
- Lyman FL, Furia T (1969) Toxicology of 2, 4, 4'-trichloro-2'-hydroxy-diphenyl ether. *IMS. Ind. Med. Surg.* 38: 64–71.
- Ma H, Zheng L, Li Y, Pan S, Hu J, Yu Z, Zhang G, Sheng G, Fu J (2013) Triclosan reduces the levels of global DNA methylation in HepG2 cells. *Chemosphere* 90: 1023–9.
- Ma K, Vatter KM, Wek RC (2002) Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 277: 18728–35.
- Maestri L, Negri S, Ferrari M, Ghittori S, Fabris F, Danesino P, Imbriani M (2006) Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonate in human tissues by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 2728–34.
- Magdoui S, Daghrir R, Brar SK, Drogui P, Tyagi RD (2013) Di 2-ethylhexylphthalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review. *J. Environ. Manage.* 127C: 36–49.
- Magliozzi R, Nardacci R, Scarsella G, Carlo V Di, Stefanini S (2003) Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric

- analysis. *Histochem. Cell Biol.* 120: 41–9.
- Mahalingaiah PKS, Singh KP (2014) Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of mcf-7 breast cancer cells. *PLoS One* 9: e87371.
- Maire MA, Rast C, Vasseur P (2005) Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases Bcl-2/Bax ratio and modifies c-myc expression in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicol. Lett.* 158: 237–45.
- Manderville RA (2005) Ambident reactivity of phenoxy radicals in DNA adduction. *Can. J. Chem.* 83: 1261–7.
- Mann AH, Price SC, Mitchell FE, Grasso P, Hinton RH, Bridges JW (1985) Comparison of the short-term effects of di(2-ethylhexyl) phthalate, di(n-hexyl) phthalate, and di(n-octyl) phthalate in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77: 116–32.
- Marigómez I, Baybay-Villacorta L (2003) Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 64: 235–57.
- Martínez-Carpio PA, Mur C, Rosel P, Navarro MA (1999) Constitutive and regulated secretion of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in MDA-MB-231 breast cancer cell line in 11-day cultures. *Cell. Signal.* 11: 753–7.
- Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2013) Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutat. Res.* 758: 41–7.
- Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J (2012) Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch. Toxicol.* 86: 1649–65.
- Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M (2008) Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 50: 37–49.
- Matyszevska D, Tappura K, Orädd G, Bilewicz R (2007) Influence of perfluorinated compounds on the properties of model lipid membranes. *J. Phys. Chem. B* 111: 9908–18.
- Mauvais-Jarvis F (2011) Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* 22: 24–33.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1249–59.
- McKee RH, Butala JH, David RM, Gans G (2004) NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps. *Reprod. Toxicol.* 18: 1–22.
- McKim JM (2010) Building a tiered approach to in vitro predictive toxicity screening: a focus on assays with in vivo relevance. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 13: 188–206.
- Mera K, Kawahara K, Tada K, Kawai K, Hashiguchi T, Maruyama I, Kanekura T (2010) ER signaling is activated to protect human HaCaT keratinocytes from ER stress induced by environmental doses of UVB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397: 350–4.
- Miège C, Choubert JM, Ribeiro L, Eusèbe M, Coquery M (2008) Removal efficiency of pharmaceuticals and personal care products with varying wastewater treatment processes and operating conditions - conception of a database and first

- results. *Water Sci. Technol.* 57: 49–56.
- Millot C, Millot JM, Morjani H, Desplaces A, Manfait M (1997) Characterization of acidic vesicles in multidrug-resistant and sensitive cancer cells by acridine orange staining and confocal microspectrofluorometry. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 1255–64.
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell Biol.* 140: 627–36.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55–63.
- Mulkiewicz E, Jastorff B, Składanowski AC, Kleszczyński K, Stepnowski P (2007) Evaluation of the acute toxicity of perfluorinated carboxylic acids using eukaryotic cell lines, bacteria and enzymatic assays. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23: 279–85.
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417: 1–13.
- Murray JI, Whitfield ML, Trinklein ND, Myers RM, Brown PO, Botstein D (2004) Diverse and specific gene expression responses to stresses in cultured human cells. *Mol. Biol. Cell* 15: 2361–74.
- Murray KE, Thomas SM, Bodour AA (2010) Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ. Pollut.* 158: 3462–71.
- Mushtaq M, Srivastava SP, Seth PK (1980) Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on glycogen metabolism in rat liver. *Toxicology* 16: 153–61.
- Nicotera P, Hartzell P, Davis G, Orrenius S (1986) The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system. *FEBS Lett.* 209: 139–44.
- NIH (2003) *ICCVAM Guidelines for the Nomination and Submission of New, Revised, and Alternative Test Methods*. National Institutes of Health, Bethesda. pp. 1–50.
- NRC (2007) *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*. The National Academies Press, Washington. pp. 216.
- NTP-CERHR (2006) *NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)*. National Institutes of Health, Bethesda. pp. 308.
- Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC, Afshari CA (1999) Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol. Carcinog.* 24: 153–9.
- OECD (2001a) *Test No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. pp. 14.
- OECD (2001b) *Test No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. pp. 14.
- OECD (2008) *Test No. 425: Acute Oral Toxicity - Up -and - Down - Procedure (UDP)*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. pp. 27.
- Oetken M, Bachmann J, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J (2004) Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 236:

1–44.

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 26: 9220–31.

Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K (2002) Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* 366: 585–94.

Olsen GW, Hansen KJ, Stevenson LA, Burris JM, Mandel JH (2003) Human donor liver and serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and other perfluorochemicals. *Environ. Sci. Technol.* 37: 888–91.

Olsen GW, Huang H-Y, Helzlsouer KJ, Hansen KJ, Butenhoff JL, Mandel JH (2005) Historical comparison of perfluorooctanesulfonate, perfluorooctanoate, and other fluorochemicals in human blood. *Environ. Health Perspect.* 113: 539–45.

Oyadomari S, Mori M (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11: 381–9.

B Ozcan L, Tabas I (2012) Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disease and Other Disorders. *Annu. Rev. Med.* 63: 317–28.

Paluch E, Sykes C, Prost J, Bornens M (2006) Dynamic modes of the cortical actomyosin gel during cell locomotion and division. *Trends Cell Biol.* 16: 5–10.

Panaretakis T, Shabalina IG, Grandér D, Shoshan MC,

DePierre JW (2001) Reactive Oxygen Species and Mitochondria Mediate the Induction of Apoptosis in Human Hepatoma HepG2 Cells by the Rodent Peroxisome Proliferator and Hepatocarcinogen, Perfluorooctanoic Acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 173: 56–64.

Pearl G, Livingston-Carr S, Durham S (2001) Integration of Computational Analysis as a Sentinel Tool in Toxicological Assessments. *Curr. Top. Med. Chem.* 1: 247–55.

Peck AM (2006) Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 386: 907–39.

Pelicano H, Carney D, Huang P (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updat.* 7: 97–110.

Pepperkok R, Ellenberg J (2006) High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 690–6.

Perencevich EN, Wong MT, Harris AD (2001) National and regional assessment of the antibacterial soap market: a step toward determining the impact of prevalent antibacterial soaps. *Am. J. Infect. Control* 29: 281–3.

Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Labrador V, Hazen MJ (2008) Carbamazepine induces mitotic arrest in mammalian Vero cells. *Mutat. Res.* 637: 124–33.

Peropadre A, Fernández Freire P, Herrero Ó, Pérez Martín JM, Hazen MJ (2013) Cytotoxic effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on cultured mammalian cells. *Curr. Top. Toxicol.* 9: 35–42.

Petrovic M (2003) Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends Anal. Chem.* 22: 685–96.

- Petrovic M, Radjenovic J, Postigo C, Kuster M, Farre M, López de Alda M, Barceló D (2008) *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste*. Springer, Berlin. pp. 35.
- Peyrou M, Cribb AE (2007) Effect of endoplasmic reticulum stress preconditioning on cytotoxicity of clinically relevant nephrotoxins in renal cell lines. *Toxicol. In Vitro* 21: 878–86.
- Pfaffenbach KT, Lee AS (2011) The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 150–6.
- Pfaller W, Balls M, Clothier R, Coecke S, Dierickx P, Ekwall B, Hanley BA, Hartung T, Prieto P, Ryan MP *et al.* (2001) Novel advanced in vitro methods for long-term toxicity testing: the report and recommendations of ECVAM workshop 45. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Altern. Lab. Anim.* 29: 393–426.
- Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P (2010) H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J. Nucleic Acids* 2010.
- Pogribny IP, Rusyn I (2012) Environmental toxicants, epigenetics, and cancer. En: *Epigenetic Alterations in Oncogenesis* (A. R. Karpf, ed.). Springer New York, New York, NY. pp. 215–32.
- Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, Canesi L (2006) Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 143: 303–15.
- Post GB, Cohn PD, Cooper KR (2012) Perfluorooctanoic acid (PFOA), an emerging drinking water contaminant: A critical review of recent literature. *Environ. Res.* 116: 93–117.
- Potez S, Luginbühl M, Monastyrskaya K, Hostettler A, Draeger A, Babiychuk EB (2011) Tailored protection against plasmalemmal injury by annexins with different Ca²⁺ sensitivities. *J. Biol. Chem.* 286: 17982–91.
- Prieto P, Baird AW, Blaauboer BJ, Castell Ripoll JV, Corvi R, Dekant W, Dietl P, Gennari A, Gribaldo L, Griffin JL *et al.* (2006) The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. *Altern. Lab. Anim.* 34: 315–41.
- Queckenberg C, Meins J, Wachall B, Doroshenko O, Tomalik-Scharte D, Bastian B, Abdel-Tawab M, Fuhr U (2010) Absorption, pharmacokinetics, and safety of triclosan after dermal administration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 570–2.
- Reinehr T (2010) Obesity and thyroid function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 316: 165–71.
- Rengarajan S, Parthasarathy C, Anitha M, Balasubramanian K (2007) Diethylhexyl phthalate impairs insulin binding and glucose oxidation in Chang liver cells. *Toxicol. In Vitro* 21: 99–102.
- Repetto G, Peso A del, Zurita JL (2008a) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3: 1125–31.
- Repetto G, Repetto M (1995) Métodos alternativos: estudios toxicológicos in vitro. En: *Toxicología avanzada*. Diaz de Santos, Madrid. pp. 37–59.
- Repetto G, Soriano MD, Martínez Salazar R, Anta ME, Repetto M (2008b) Módulo 11. Legislación Internacional en Toxicología. El REACH. En: *Postgrado de Toxicología*. CD-ROM. Ilustre Colegio Oficial de Químicos de Sevilla, Sevilla.

pp. 1–94.

Repetto M, Repetto G (2009) Evaluación de la toxicidad y del riesgo. Toxicología experimental. En: Toxicología fundamental. Díaz de Santos, Madrid. pp. 403–66.

Ricart M, Guasch H, Alberch M, Barceló D, Bonnineau C, Geiszinger A, Farré MI, Ferrer J, Ricciardi F, Romaní AM *et al.* (2010) Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms. *Aquat. Toxicol.* 100: 346–53.

Rich T, Allen RL, Wyllie AH (2000) Defying death after DNA damage. *Nature* 407: 777–83.

Rocheffort H, Glondou M, Sahla ME, Platet N, Garcia M (2003) How to target estrogen receptor-negative breast cancer? *Endocr. Relat. Cancer* 10: 261–6.

Rodella LF, Ricci F, Borsani E, Stacchiotti A, Foglio E, Favero G, Rezzani R, Mariani C, Bianchi R (2008) Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Histol. Histopathol.* 23: 433–9.

Rodricks J V, Swenberg J a, Borzelleca JF, Maronpot RR, Shipp AM (2010) Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Crit. Rev. Toxicol.* 40: 422–84.

Rodríguez PEA, Sanchez MS (2010) Maternal exposure to triclosan impairs thyroid homeostasis and female pubertal development in Wistar rat offspring. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 73: 1678–88.

Roggen EL (2011) In vitro Toxicity Testing in the Twenty-First Century. *Front. Pharmacol.* 2: 3.

Romero D, Gómez-Zapata M, Luna A, García-Fernández AJ (2004) Morphological

characterization of renal cell lines (BGM and VERO) exposed to low doses of lead nitrate. *Histol. Histopathol.* 19: 69–76.

Rosen MB, Abbott BD, Wolf DC, Corton JC, Wood CR, Schmid JE, Das KP, Zehr RD, Blair ET, Lau C (2008) Gene profiling in the livers of wild-type and PPARalpha-null mice exposed to perfluorooctanoic acid. *Toxicol. Pathol.* 36: 592–607.

Rouse J, Jackson SP (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297: 547–51.

Russell WMS, Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen Publishing Ltd., London. pp. 239.

Rusyn I, Corton JC (2012) Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 750: 141–58.

Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ (2006) Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* 4: e374.

Rutkowski DT, Hegde RS (2010) Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J. Cell Biol.* 189: 783–94.

Ryu JY, Whang J, Park H, Im JY, Kim J, Ahn MY, Lee J, Kim HS, Lee BM, Yoo SD, Kwack SJ, Oh JH, Park KL, Han SY, Kim SH (2007) Di(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis through peroxisome proliferators-activated receptor-gamma and ERK 1/2 activation in testis of Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 70: 1296–303.

- Samuel VT, Shulman GI (2012) Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148: 852–71.
- Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, Kalen AL, Goswami PC (2009) Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 11: 2985–3011.
- Satake S, Nakamura C, Minamide Y, Kudo S, Maeda H, Chihaya Y, Kamimura Y, Miyajima H, Sasaki J, Goryo M, Okada K (2010) Effect of a Large Dose of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on Hepatic Peroxisome in Cynomolgus Monkeys (*Macaca Fascicularis*). *J. Toxicol. Pathol.* 23: 75–83.
- Scheers EM, Ekwall B, Dierickx PJ (2001) In vitro long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on Hep G2 cells and comparison with acute human toxicity data. *Toxicol. In Vitro* 15: 153–61.
- Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 5523–7.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 97: 695–710.
- Schröder M (2008) Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 862–94.
- Schröder M, Kaufman RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 739–89.
- Segundo C, Medina F, Rodríguez C, Martínez-Palencia R, Leyva-Cobián F, Brieva JA (1999) Surface molecule loss and bleb formation by human germinal center B cells undergoing apoptosis: role of apoptotic blebs in monocyte chemotaxis. *Blood* 94: 1012–20.
- Seibert H, Balls M, Fentem JH, Bianchi V., Clothier RH, Dierickx PJ, Ekwall B, Garle MJ, Gómez-Lechón MJ, Gribaldo L *et al.* (1996) Acute Toxicity Testing In Vitro and the Classification and Labelling of Chemicals. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 16. *Altern. to Lab. Anim. ATLA* 24: 499–510.
- Sha H, He Y, Yang L, Qi L (2011) Stressed out about obesity: IRE1 α -XBP1 in metabolic disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* 22: 374–81.
- Shabalina IG, Panaretakis T, Bergstrand A, DePierre JW (1999) Effects of the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid, on apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis* 20: 2237–46.
- Sharpe RM, Irvine DS (2004) How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 328: 447–51.
- Sherr CJ, Roberts JM (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 18: 2699–711.
- Shiloh Y, Ziv Y (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 197–210.
- Shvedova AA, Kommineni C, Jeffries BA, Castranova V, Tyurina YY, Tyurin VA, Serbinova EA, Fabisiak JP, Kagan VE (2000) Redox cycling of phenol induces oxidative stress in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 114: 354–64.

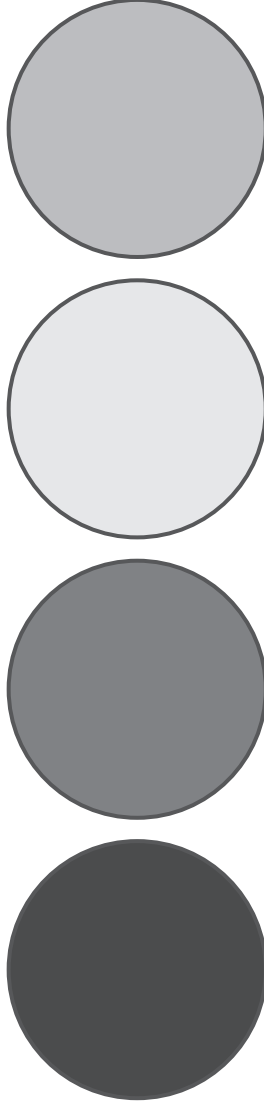
- Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M (2011) Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res. Rev.* 10: 146–52.
- Silva MJ, Reidy JA, Herbert AR, Preau JL, Needham LL, Calafat AM (2004) Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 1226–31.
- Simmons SO, Fan C-Y, Ramabhadran R (2009) Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol. Sci.* 111: 202–25.
- Singer H, Müller S, Tixier C, Pillonel L (2002) Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environ. Sci. Technol.* 36: 4998–5004.
- Singh NP, Stephens RE (1986) A novel technique for viable cell determinations. *Stain Technol.* 61: 315–8.
- Smyth D (1978) *Alternatives to animal experiments*. Scholar Press and Research Defence Society, London. pp. 218.
- Sonnenbichler J, Scalera F, Sonnenbichler I, Weyhenmeyer R (1999) Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 1375–83.
- Sonoda E, Hochegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S (2006) Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. 5: 1021–9.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1409–16.
- Spriggs KA, Bushell M, Willis AE (2010) Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol. Cell* 40: 228–37.
- Steenland K, Fletcher T, Savitz DA (2010) Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). *Environ. Health Perspect.* 118: 1100–8.
- Stephens DJ, Allan VJ (2003) Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 300: 82–6.
- Storr SJ, Woolston CM, Zhang Y, Martin SG (2013) Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage. *Antioxid. Redox Signal.* 18: 2399–408.
- Stuart M, Lapworth D, Crane E, Hart A (2012) Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci. Total Environ.* 416: 1–21.
- Sturley SL, Hussain MM (2012) Lipid droplet formation on opposing sides of the endoplasmic reticulum. *J. Lipid Res.* 53: 1800–10.
- Sunyer J, Jarvis D, Gotschi T, Garcia-Esteban R, Jacquemin B, Aguilera I, Ackerman U, Marco R de, Forsberg B, Gislason T, Heinrich J, Norbäck D, Villani S, Künzli N (2006) Chronic bronchitis and urban air pollution in an international study. *Occup. Environ. Med.* 63: 836–43.
- Svensson K, Hernández-Ramírez RU, Burguete-García A, Cebrián ME, Calafat AM, Needham LL, Claudio L, López-Carrillo L (2011) Phthalate exposure associated with self-reported diabetes among Mexican women. *Environ. Res.* 111: 792–6.
- Tabas I, Ron D (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13: 184–90.

- Tamura I, Kanbara Y, Saito M, Horimoto K, Satoh M, Yamamoto H, Oyama Y (2012) Triclosan, an antibacterial agent, increases intracellular Zn(2+) concentration in rat thymocytes: its relation to oxidative stress. *Chemosphere* 86: 70–5.
- Tan L (2002) Use of Antimicrobial Agents in Consumer Products. *Arch. Dermatol.* 138: 1082.
- Tanaka T, Halicka HD, Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z (2006) Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle* 5: 1940–5.
- Tang-Péronard JL, Andersen HR, Jensen TK, Heitmann BL (2011) Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans: a review. *Obes. Rev.* 12: 622–36.
- Tao L, Kannan K, Wong CM, Arcaro KF, Butenhoff JL (2008) Perfluorinated compounds in human milk from Massachusetts, U.S.A. *Environ. Sci. Technol.* 42: 3096–101.
- Tatarazako N, Ishibashi H, Teshima K, Kishi K, Arizono K (2004) Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environ. Sci.* 11: 133–40.
- Ternes TA, Joss A, Siegrist H (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38: 392A–399A.
- Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M (2001) Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am. J. Ind. Med.* 39: 100–11.
- Tinevez J-Y, Schulze U, Salbreux G, Roensch J, Joanny J-F, Paluch E (2009) Role of cortical tension in bleb growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 18581–6.
- Toussaint O, Dumont P, Dierick JF, Pascal T, Fripiat C, Chainiaux F, Magalhaes JP, Eliaers F, Remacle J (2000a) Stress-induced premature senescence as alternative toxicological method for testing the long-term effects of molecules under development in the industry. *Biogerontology* 1: 179–83.
- Toussaint O, Medrano EE, Zglinicki T von (2000b) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* 35: 927–45.
- Toussaint O, Salmon M, Pascal T, Magalhaes JP, Chainiaux F (2005) Stress-induced Premature Senescence (SIPS). *eLS* [doi: 10.1038/npg.els.0003865].
- Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T (1997) Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab. Invest.* 76: 365–74.
- Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP (1998) Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28: 319–61.
- Ullrich A, Stolz DB, Ellis EC, Strom SC, Michalopoulos GK, Hengstler JG, Runge D (2009) Long term cultures of primary human hepatocytes as an alternative to drug testing in animals. *ALTEX* 26: 295–302.
- UNEP (2012) *Global Chemicals Outlook: Towards Sound Management of Chemicals*. United Nations Environment Programme, Nairobi. pp. 44.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG):

- A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27: 120–39.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1–40.
- Vandhana S, Coral K, Jayanthi U, Deepa PR, Krishnakumar S (2013) Biochemical changes accompanying apoptotic cell death in retinoblastoma cancer cells treated with lipogenic enzyme inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831: 1458–66.
- Vijg J, Campisi J (2008) Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* 454: 1065–71.
- Walker C, Sibly R, Hopkin S, Peakall D (2012) Ecotoxicology: looking to the future. En: *Principles of ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton. pp. 313–23.
- Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081–6.
- Walther TC, Farese R V (2012) Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 687–714.
- Walum E (1998) Acute oral toxicity. *Environ. Health Perspect.* 106 Suppl : 497–503.
- Wang J, Yin Y, Hua H, Li M, Luo T, Xu L, Wang R, Liu D, Zhang Y, Jiang Y (2009) Blockade of GRP78 sensitizes breast cancer cells to microtubules-interfering agents that induce the unfolded protein response. *J. Cell. Mol. Med.* 13: 3888–97.
- Wang T, Uezato T, Miura N (2001) Inhibition effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mouse-liver lysosomal vacuolar H(+)-ATPase. *J. Cell. Biochem.* 81: 295–303.
- Welte MA (2007) Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol.* 17: 363–9.
- Windler L, Height M, Nowack B (2013) Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. *Environ. Int.* 53: 62–73.
- Witorsch RJ, Thomas J a (2010) Personal care products and endocrine disruption: A critical review of the literature. *Crit. Rev. Toxicol.* 40 Suppl 3: 1–30.
- Wittassek M, Koch HM, Angerer J, Brüning T (2011) Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach. *Mol. Nutr. Food Res.* 55: 7–31.
- Woodward KN (1990) Phthalate esters, cystic kidney disease in animals and possible effects on human health: a review. *Hum. Exp. Toxicol.* 9: 397–401.
- Worth A, Balls M (2002) Alternative (non-animal) methods for chemicals testing: current status and future prospects. A report prepared by ECVAM and the ECVAM working group on chemicals. *Altern. to Lab. Anim. ATLA* 30: 1–125.
- Wu J, Basha MR, Brock B, Cox DP, Cardozo-Pelaez F, McPherson CA, Harry J, Rice DC, Maloney B, Chen D, Lahiri DK, Zawia NH (2008) Alzheimer's disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): evidence for a developmental origin and environmental link for AD. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28: 3–9.
- Yang H, Fogo AB (2010) Cell senescence in the aging kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21: 1436–9.
- Yang Q, Abedi-Valugerdi M, Xie Y, Zhao X-Y, Möller G, Dean Nelson B, DePierre JW (2002) Potent suppression of the adaptive immune response

- in mice upon dietary exposure to the potent peroxisome proliferator, perfluorooctanoic acid. *Int. Immunopharmacol.* 2: 389–97.
- Yao X, Zhong L (2005) Genotoxic risk and oxidative DNA damage in HepG2 cells exposed to perfluorooctanoic acid. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 587: 38–44.
- Yarborough A, Zhang YJ, Hsu TM, Santella RM (1996) Immunoperoxidase detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in aflatoxin B1-treated rat liver and human oral mucosal cells. *Cancer Res.* 56: 683–8.
- Yasumura Y, Kawakita M (1963) Studies on SV40 in tissue culture-Preliminary step for cancer research in vitro. *Nippon Rinsho.* 21: 1201–19.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107: 881–91.
- Zareitalabad P, Siemens J, Hamer M, Amelung W (2013) Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in surface waters, sediments, soils and wastewater - A review on concentrations and distribution coefficients. *Chemosphere* 91: 725–32.
- Zhang K, Kaufman RJ (2004) Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279: 25935–8.
- Zhang L-J, Li Z-Q, Yang Y-P, Li X-W, Ji J-F (2009) Tunicamycin suppresses cisplatin-induced HepG2 cell apoptosis via enhancing p53 protein nuclear export. *Mol. Cell. Biochem.* 327: 171–82.
- Zhang X, Zhang K (2012) Endoplasmic reticulum stress-associated lipid droplet formation and type II diabetes. *Biochem. Res. Int.* 2012: 247275.
- Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433–9.
- Zhou S, Wallace KB (1999) The effect of peroxisome proliferators on mitochondrial bioenergetics. *Toxicol. Sci.* 48: 82–9.
- Zucco F, Angelis I De, Testai E, Stammati A (2004) Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicol. In Vitro* 18: 153–63.
- Zuckerbraun H (1998) ORAL SCIENCES Triclosan : cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro. 628–36.
- Zuckerbraun HL, Babich H, May R, Sinensky MC (1998) Triclosan: cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro. *Eur. J. Oral Sci.* 106: 628–36.

ANEXO I



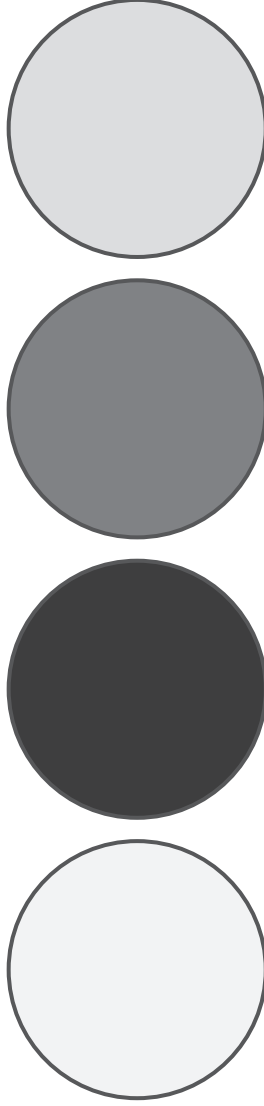
Gen	Nombre	Categoría	MDA	HaCaT	MCF7	OMIM
ABCA2	ATP-BINDING CASSETTE 2	ATPasas ABC	0.261	-0.004	0.958	600047
ABCA4	ATP-BINDING CASSETTE 4	ATPasas ABC	0.321	0.048	0.771	601691
ABCA8	ATP-BINDING CASSETTE 8	ATPasas ABC	0.037	-0.100	-0.917	612505
ACADS	ACYL-CoA DEHYDROGENASE, SHORT-CHAIN	β -oxidación	0.542	-1.142	0.179	606885
ANGPTL4	ANGIOPOIETIN-LIKE 4	Obesidad	-1.083	-0.114	-0.364	605910
APOB	APOLIPOPROTEIN B	Lípidos	1.028	-0.649	-0.086	107730
ARH	LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR ADAPTOR PROTEIN 1	Receptores de lípidos	0.520	0.471	1.092	605747
CB1	CANNABINOID RECEPTOR 1	Receptores	-0.854	-0.294	-1.069	114610
CCNA2	CYCLIN A2	Ciclo celular	0.238	0.171	0.913	123835
CDC34	CDC34	Ciclo celular	0.037	0.089	0.895	116948
CDC37	CDC37	Ciclo celular	0.122	-0.183	0.767	605065
CDK3	CDK3	Ciclo celular	0.008	-0.885	-0.849	123828
CDK5R1	p35	Ciclo celular	1.313	-0.866	-0.168	603460
CDK6	CDK6	Ciclo celular	-0.069	0.148	-0.863	603368
CDKN1C	p57 - KIP2	Ciclo celular	-0.086	-0.165	-0.780	600856
CDKN2C	p18	Ciclo celular	0.080	0.008	0.853	603369
CETP	CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN	Lípidos	0.933	0.110	-0.105	118470
CH25H	CHOLESTEROL 25-HYDROXYLASE	Lípidos	-1.113	0.165	0.117	604551
CPT2	CARNITINE PALMITOYL TRANSFERASE II	β -oxidación	-0.919	0.017	-0.023	600650
CYP2B6	CYTOCHROME P450, SUBFAMILY IIB	Citocromos P450	-0.025	-0.054	0.762	123930
CYP46A1	CYTOCHROME P450, FAMILY 46	Citocromos P450	-0.050	-1.098	0.042	604087
CYP7A1	CYTOCHROME P450, SUBFAMILY VIIA	Citocromos P450	-1.191	0.832	-0.713	118455
DAB1	DISABLED HOMOLOG 1	Sistema nervioso Lípidos	0.511	0.258	0.853	603448
ERG25	STEROL C4-METHYLOXIDASE-LIKE; SC4MOL	Síntesis de colesterol	-0.298	-0.084	-0.768	607545
FABP2	FATTY ACID-BINDING PROTEIN 2	Lípidos	-0.945	-0.548	-0.799	134640
FABP4	FATTY ACID-BINDING PROTEIN 4	Lípidos	-0.033	0.125	0.995	600434
FACTOR D	COMPLEMENT FACTOR D	Obesidad	0.623	0.378	0.853	134350
FDPS	FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE	Síntesis de colesterol	-0.396	-0.761	-0.546	134629

TABLA 15. Resumen de los genes alterados después de 120h de exposición a TCS 0.5/1 μ M. Se muestran el código del gen, su nombre y categoría, los niveles de expresión para cada línea celular y el código OMIM®.

Gen	Nombre	Categoría	MDA	HaCaT	MCF7	OMIM
GADD45A	GROWTH ARREST- AND DNA DAMAGE-INDUCIBLE GENE GADD45	Respuesta de estrés / Daño ADN	-0.075	-0.541	-0.836	126335
H1F0	H1 HISTONE FAMILY	Histonas	-0.140	0.761	0.250	142708
HNF4A	HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4-ALPHA	Factores de transcripción	-0.262	0.090	-0.777	600281
IL12B	INTERLEUKIN 12B	Interleuquinas	0.878	0.118	0.636	161561
IL1B	INTERLEUKIN 1-BETA	Citoquinas	-0.851	0.288	-0.762	147720
LBR	LAMIN B RECEPTOR	Receptores	-0.305	0.004	-0.930	600024
LCAT	LECITHIN-CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE	Lípidos	0.586	-0.277	0.757	606967
LDLr	LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR	Receptores de lípidos	0.432	0.541	-0.851	606945
LEPTIN	LEPTIN	Obesidad	-0.779	-0.162	0.427	164160
LIPE	LIPASE, HORMONE-SENSITIVE	Lípidos Obesidad	-0.598	0.951	-0.048	151750
MSR1	MACROPHAGE SCAVENGER RECEPTOR	Receptores de lípidos	-0.129	-0.356	-1.192	153622
NPY	NEUROPEPTIDE Y	Sistema nervioso	1.187	-0.133	0.414	162640
NR1H4	NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 1	Lípidos / Factor de transcripción	0.552	-0.027	0.825	603826
OSBPL5	OXYSTEROL-BINDING PROTEIN-LIKE PROTEIN 5	Receptores de lípidos	1.147	-1.017	-0.918	606733
PCSK9	PROPROTEIN CONVERTASE, SUBTILISIN/KEXIN-TYPE, 9	Lípidos	-0.172	0.111	-0.789	607786
PPARGC1	PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-GAMMA	Factores de transcripción	0.051	0.758	0.099	604517
PRKCQ	PROTEIN KINASE C	Quinasas	-0.025	0.680	1.066	600448
REELIN	REELIN	Sistema nervioso	0.599	-0.112	1.040	600514
SLC27A5	FATTY ACID TRANSPORT PROTEIN 5	Lípidos	-0.326	-1.032	0.318	603314
SMPD1	SPHINGOMYELINASE	Lípidos	0.602	-1.008	-0.655	607608

TABLA 15. Resumen de los genes alterados después de 120h de exposición a TCS 0.5/1 μ M. Se muestran el código del gen, su nombre y categoría, los niveles de expresión para cada línea celular y el código OMIM®.

ANEXO II



PUBLICACIONES

- **Peropadre A**, Fernández Freire P, Herrero O, Pérez Martín JM, Hazen MJ (2013) Cytotoxic effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on cultured mammalian cells. *Current Topics in Toxicology* 9:35-42.
- **Peropadre A**, Fernández Freire P, Pérez Martín JM, Herrero O, Hazen MJ (2014) Di (2-ethylhexyl) phthalate induces endoplasmic reticulum stress in renal and epithelial cultured cells. *Journal of Hazardous Materials* (En revisión: HAZMAT-D-14-00632).

